THESE

de

DOCTORAT D'ETAT

ès Sciences Naturelles

Presentée

à l'Université Pierre et Marie Curie

Paris VI

Mahmoud MEHRAD

pour obtenir le grade de DOCTEUR ès SCIENCES

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES LUTEOVIRUS

PRINCIPALEMENT CELUI

DE L'ENROULEMENT DE LA POMME DE TERRE

SOUTENUE LE 16/03/82 ~~OCTOBRE 1981~~

devant le jury composé de

Monsieur le Professeur Pierre CHOUARD — Président
Monsieur le Professeur Gilbert BOMPEIX — Examinateur
Monsieur le Professeur Emile MIGIGNIAC
Monsieur Pierre CORNUET
Monsieur Hervé LAPIERRE

UNIV.
LIBRARY

T H E S E

de

D O C T O R A T D ' E T A T

ès Sciences Naturelles

Présentée

à l'Université Pierre et Marie Curie

PARIS VI

MAHMOUD M E H R A D

pour obtenir le grade de DOCTEUR ès SCIENCES

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES LUTEOVIRUS PRINCIPALEMENT CELUI DE L'ENROULEMENT DE LA POMME DE TERRE

Soutenue le 16/02/82 ~~OCTOBRE 1981~~

devant le jury composé de :

- Monsieur le Professeur Pierre CHOUARD — Président
- Monsieur le Professeur Gilbert BOMPEIX — Examinateur
- Monsieur le Professeur Emile MIGIGNIAC — "
- Monsieur Pierre CORNUET Directeur de Recherche de l'INRA — "
- Monsieur Hervé LAPIERRE Maître de Recherche de l'INRA — "

A ma femme BEYDOKHT

Pour sa longue attente et qui su, elle seule supporter par son travail, les difficultés, la vie et l'éducation de nos enfants, pendant ces six années.

A nos enfants

ARMAGHAN

SOLMAZ

Ces années seront une expérience enrichissante pour leur éducation et leur vie.

A la mémoire de mon père

et de ma mère

Je souhaiterais tout d'abord exprimer ma gratitude à Monsieur le Professeur CHOUARD, pour m'avoir accepté dans son Université et m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Pendant toutes ces années de préparation, j'ai bénéficié de son aide, de sa compréhension et de ses conseils dont je lui serai toujours reconnaissant.

Qu'il reçoive ici mes remerciements pour m'avoir fait obtenir une bourse afin de mener à bien ce travail.

Je tiens à remercier :

Monsieur le Professeur BOMPEIX pour son aide, son amabilité, ses conseils et l'intérêt qu'il a manifesté dans cette recherche en acceptant d'être Professeur responsable et Directeur de ma thèse.

Monsieur le Professeur MIGIGNIAC pour avoir accepté d'être jury de ma thèse.

Monsieur le Professeur LANCE pour l'accueil chaleureux qu'il m'a offert à plusieurs reprises et pour ses bons conseils.

Monsieur CORNUET, Directeur de Recherche de la Station de Pathologie Végétale de l'INRA de VERSAILLES où j'ai réalisé mes recherches. Je le remercie aussi pour la correction de ma thèse.

Monsieur LAPIERRE, pour m'avoir donné le sujet de ce travail, et pour sa correction.

Je remercie aussi :

Tous mes collaborateurs et tous mes collèges pour la préparation du matériel utile à cette recherche, soit à l'INRA de VERSAILLES, soit à l'Institut PIERRE et MARIE CURIE de PARIS.

Madame MICHON, pour les prises de photographies dans microscope électronique et la partie de coupe Ultra Fine.

Madame COUSIN, pour les diapositive concernant l'Enroulement violacé de la Pomme de terre qu'elle a eu la gentillesse de me donner.

Tous les collègues du laboratoire de phytopharmacie de l'INRA pour la fourniture du matériel, pucerons et plantes.

Madame LAROQUE, laboratoire de sérologie Station de Pathologie de l'INRA pour son aide.

Je remercie Monsieur YOT pour sa collaboration à l'Institut PIERRE et MARIE CURIE de PARIS, section de Biologie, pour la partie Acide Nucléique.

Que toutes les personnes qui ont contribué à la rédaction de ce mémoire trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

LISTE DES ABREVIATIONS

AMV	:	Alfalfa Mosaic Virus
BAB	:	Bacilliforme Agaricus Bisporus
BMV	:	Brome Mosaic Virus
BMY	:	Beet Mild Yellowing
BWYV	:	Beet Western Yellow Virus
BYDV	:	Barley Yellow Dwarf Virus
BYV	:	Beet Yellows (groupe closterovirus)
CaMV	:	Cauliflower Mosaic Virus (virus de la Mosaïque du Chou-fleur)
CCMV	:	Cowpea Chlorotic Mottle Virus
CER	:	Carnation Etch Ring Virus
CFMV	:	Cockfoot Mottle Virus
CLV	:	Carnation Latent Virus
CMoV	:	Carnation Mottle Virus
CMV	:	Cucumber Mosaic Virus
CRsV	:	Carnation Ring spot Virus
DMV	:	Dahlia Mosaic Virus
MMV	:	Mirabilis Mosaic Virus
MSV	:	Maize Streak Virus
PAMV	:	Potato Aucuba Mosaic Virus
PeaLRV	:	Pea Leafroll Virus - (Jaunisse Apicale du Pois)
PMTV	:	Potato Mop-Top Virus
PSTV	:	Potato Spindle Tuber Virus
PTV	:	Potato T Virus
PVM	:	Potato Virus M
PVS	:	Potato Virus S
PXV	:	Potato X Virus
PYV	:	Potato Y Virus

PYDV	:	Potato Yellow Dwarf Virus
RMV	:	Rhopalosiphum Maidis Virus (BYDV)
RPV	:	Rhopalosiphum Padi Virus (BYDV)
RYMV	:	Rice Yellow Mosaic Virus
SBMV	:	Southern Bean Mosaic Virus
SDV	:	Soybean Dwarf Virus
SMV	:	Sowbane Mosaic Virus
StYvV	:	Sowthistle Yellow Vein Virus
TMV	:	Tobacco Mosaic Virus - (Mosaïque du Tabac)
TBSV	:	Tomato Bushy Stunt Virus
TRosV	:	Turnip Rosette Virus
TRV	:	Tobacco Rattle Virus
TYMV	:	Turnip Yellow Mosaic Virus
VEPT	:	Virus de l'Enroulement de la Pomme de terre (PLRV)
VJMB	:	Jaunisse Modérée de la Betterave (BWYV)
VJNO	:	Virus de la Jaunisse Nanisante de l'Orge (BYDV)

ADN	:	acide désoxyribonucléique
APT	:	acide phosphotungstique
ARN	:	acide ribonucléique
DO	:	densité optique
EDTA	:	acide éthylène diamine tétracétique
ELISA	:	enzyme linked immunosorbent assay
FREON	:	fluoro carbone type $C_2 Cl_3 F_3$ = DAIFON S_3
IEM	:	immunoelectromicroscope
Ø	:	diamètre
PEG 6000	:	polyéthylène glycol poids moléculaire 6000
PM	:	poids moléculaire
TAMPON P	:	tampon phosphate disodique monopotassique
TAMPON PEN	:	tampon phosphate disodique monopotassique contient EDTA + β mercaptoéthanol
UC	:	ultracentrifugation

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS I

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES LUTEOVIRUS
Principalement à celui
DE L'ENROULEMENT DE LA POMME DE TERRE

INTRODUCTION 1

HISTORIQUE du VIRUS 13

IMPORTANCE ECONOMIQUE 19

CHAPITRE I MATERIEL et METHODES 21

A. ORIGINE DU VIRUS. 21

B. LES PLANTES ET LES CONDITIONS DE CULTURE. 21

C. ELEVAGE DES PUCERONS. 22

D. TRANSMISSION APHIDIENNE. 22

1. De plante à plante. 22

2. D'un extrait purifié à P. floridana. 22

E. ISOLEMENT DU VIRUS. 23

1. Les milieux d'extraction du virus. 23

2. Les clarifiants. 24

3. Concentration et purification du virus. 27

F. ETUDE AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE. 28

G. EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES. 29

H. DEGRADATION ENZYMATIQUE DES ACIDES NUCLEIQUES. 30

I. ELECTROPHORESE DES ACIDES NUCLEIQUES 31

J. IMMUNISATION. 32

CHAPITRE II. P U R I F I C A T I O N du V I R U S 38

A. EFFET DE LA FORCE IONIQUE 41

B. EFFET DE L'EDTA 42

C. EFFET DU BUTANOL ET DU CHLOROFORME 45

D. EFFET DU FREON 113 47

E. EFFET DE LA FINESSE DE BROYAGE 47

F. CONCENTRATION DU VIRUS 49

G. CONCLUSION 58

CHAPITRE III. PROPRIETES P H Y S I C O - C H I M I Q U E S du V E P T 66

A. ASPECT EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE 66

B. SPECTRE D'ABSORPTION EN UV DES NUCLEOPROTEINES 68

C. COMPORTEMENT DES PARTICULES VIRALES DANS UN GRADIENT DE SACCHAROSE 74

D. COMPORTEMENT DES PARTICULES VIRALES DANS DIFFERENTS SELS DE CESIUM 77

E. L'ACIDE NUCLEIQUE DU VIRUS 81

F. EFFET DU LAURYL SULFATE DE SODIUM SUR LES PARTICULES VIRALES 91

CHAPITRE IV. P R O P R I E T E S I M M U N O L O G I Q U E S du V E P T. 93

A. PREPARATION DE L'ANTISERUM 94

B. TEST DE PRECIPITATION OU "RING TEST" 95

C. TITRATION DE L'ANTISERUM PAR LA METHODE "RING TEST" 96

D. CONSEQUENCE 100

E. DETECTION DU VEPT PAR LA TECHNIQUE SEROLOGIQUE ELISA 101

F. CONCLUSION DU TEST ELISA 110

CHAPITRE V. L O C A L I S A T I O N et C O N C E N T R A T I O N du V I R U S dans la P L A N T E 111

A. DONNEES ULTRASTRUCTURALES 111

B. DONNEES OBTENUES PAR PURIFICATION DIRECTE 115

C. DONNEES SEROLOGIQUES 117

D. CONCLUSION 118

CHAPITRE VI. M I S E en E V I D E N C E I M M U N O L O G I Q U E du V E P T . 119

A. DIAGNOSTIC DU VEPT DANS LA PLANTE DE POMME DE TERRE 119

B. OBSERVATION DES SYMPTOMES DANS LES PLANTES DE POMME DE TERRE 120

C. OBSERVATION DES SYMPTOMES SUR LES PLANTES TEST 121

D. OBSERVATION EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE 121

E. DIAGNOSTIC DU VEPT PAR IMMUNOELECTROMICROSCOPIE (IEM) 122

F. CHEZ LE PUCERON VECTEUR MYZUS PERSICAE 122

CHAPITRE VII. QUELQUES O B S E R V A T I O N S sur le groupe des L U T E O V I R U S 128

A. SYMPTOMATOLOGIE 130

B. STRUCTURE DE LA NUCLEOCAPSIDE 132

C. QUELQUES ETUDES A ENTREPRENDRE POUR MIEUX DEFINIR LE GROUPE DES LUTEOVIRUS 139

CHAPITRE VIII. CONCLUSION 140

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES (177 REFERENCES) I - XIX -

I N T R O D U C T I O N

Si la Virologie Végétale a participé aux progrès de la Virologie en général, elle souffre encore du manque d'approfondissement de nos connaissances concernant de nombreux virus.

A son actif on peut cependant rappeler que c'est avec le virus de Mosaïque du Tabac que l'on a pu montrer que l'acide nucléique était le facteur infectieux chez un virus, GIERER et SCHRAM (1956). Plus récemment la découverte de l'aminoacylation possible de certains ARN, PINCK et al. (1970) montre que la virologie végétale participe bien au développement de nos connaissances fondamentales.

Cependant à son passif on peut lui reprocher le nombre réduit d'analyses précises concernant les propriétés physicochimiques de beaucoup de virus. Cet état de fait se traduit par un regroupement encore limité des virus de plantes comme l'indique le Tableau I :

T A B L E A U I

Virus à ADN

I Virus à ADN monocaténaire.

Symétrie cubique :

Groupe des Gemini Virus "Maïs Streak Virus".

II Virus à ADN bicaténaire.

Symétrie cubique :

Groupe des "Caulimovirus" (Virus de la Mosaïque du Chou fleur)

Virus à ARN

I Virus à ARN monocaténaire :

Symétrie cubique

- Virus à 1 composant.

Groupe du SBMV

Groupe des "Tombusvirus"

Groupe des "Tymovirus"

Groupe des "luteovirus"

- Virus à 2 composants.

Groupe des "Nepovirus"

Groupe des "Comovirus"

Groupe du "Broad Bean Wild Virus"

Groupe du "Carnation Ring Spot Virus"

- Virus à 3 composants.

Isocapsides :

"Cucumovirus"

"Bromovirus"

Heterocapsides :

"Ilarvirus"

"Alfalfa Mosaic Virus"

- Quelques virus non classés à symétrie cubique

Symétrie hélicoïdale

a - Sans enveloppe,

- Virus à 1 composant.

Groupe des "Tobamovirus"

Groupe des "Potexvirus"

Groupe des "Potyvirus"

Groupe des "Carlavirus"

Groupe des "Closterovirus"

- Virus à 2 composants.

Groupe des "Tobravirus"

- Virus à 3 composants.

Groupe des "Hordeivirus"

b - Avec enveloppe,

Groupe "Rhabdovirus"

II - Virus à ARN bicaténaire :

Symétrie cubique ; PHYTOREOVIRUS

1.- Virus à 12 ARN "Clover Wound Tumor Virus", "Rice Dwarf"

2.- Virus à 10 ARN :

"FIJIVIRUS"

"Maize Rough Dwarf", "Fiji Disease"

3.- Virus des champignons :

Penicillium Virus 1,2

Les virus à ADN en nombre réduit sont bien "rassemblés essentiellement dans deux familles" - On connait en effet de nouveaux types de virus à DNA.

Par contre pour les virus à ARN monocaténaires, à côté d'un certains groupes bien définis, il subsiste encore de très nombreux virus pour lesquels aucun rapprochement n'est encore réalisé.

Cette situation est particulièrement vraie pour les virus à symétrie cubique (le virus de l'Enroulement de la Pomme de terre). C'est à un virus apparenté au groupe des Lutéovirus que nous avons consacré nos efforts pour mieux caractériser ses propriétés physico-chimiques.

Ce virus, par son mode de transmission, se rapproche des Lutéovirus, par ses propriétés physiques il s'en éloigne considérablement. La possibilité de mieux caractériser ce virus devrait nous permettre d'envisager l'étude de ses propriétés antigéniques et par la même d'une part le comparer aux autres Lutéovirus, d'autre part d'aborder des apllications agronomiques.

En effet la fabrication d'un antisérum offrirait la possibilité de réaliser un diagnostic immunologique de ce virus, diagnostic irréalisé jusque là.

Les deux premiers chapitres de ce mémoire tentent de situer le Virus de l'Enroulement de la Pomme de terre d'une part en tant que virus apparenté aux Lutéovirus, d'autre part en tant que pathogène de la Pomme de terre. Dans nos résultats nous reprendrons cette dichotomie : apports fondamentaux concernant les propriétés physicochimiques de virus et les conséquences qui en découlent pour ce qui est de son intégration au groupe des Lutéovirus et d'autre part les applications que l'on peut attendre en agriculture de la mise en oeuvre d'un diagnostic sérologique.

LE VIRUS DE L'ENROULEMENT DE LA POMME DE TERRE et LES LUTEOVIRUS

Les luteovirus ont été définis comme un nouveau groupe de virus à la conférence de Madrid en septembre 1975 par le Comité International de Taxanomie sur les virus (SHEPHERD et al. 1976). (principal type : VJNO).

Les principaux caractères des virus de ce groupe sont : leur transmission persistante sur le mode circulant par un vecteur aphidien, l'impossibilité de transmettre mécaniquement ces virus aux plantes.

La concentration extrêmement faible des particules virales dans la plante-hôte infectée est dûe à leur localisation dans le phloème (ROCHOW 1969a) (JENSEN 1969, KOJIMA 1973/1974).

Ces particules sont isométriques, de 25 à 30 nm de diamètre. Il n'y a pas d'évidence de la multiplication du virus dans le vecteur (PALIWAL et SINHA 1970). Le génome du VJNO et de la Jaunisse Modérée de la Betterave a été analysé. Il contient un seul composant ARN monocaténaire d'un poids moléculaire de 2.10^6 daltons (BRAKKE et ROCHOW 1974) (FALK, DUFFUS, MORRIS, 1977).

Les particules isométriques de VJNO ont un coefficient de sédimentation de 115-118 s (ROCHOW et BRAKKE 1964). Il y a une relation sérologique entre les différentes souches du VJNO et du Beet Western Yellow", aussi entre le BMYV et le virus du jaunissement du navet (DUFFUS et RUSSEL 1972) ainsi qu'entre le BMYV et le Virus de la Jaunisse Modérée de la Betterave (DUFFUS et RUSSEL 1975).

On a trouvé récemment une relation sérologique entre le virus de la Jaunisse Apicale du Pois et BWYV (DUFFUS abrégé).

Les principaux membres du groupe luteovirus sont : le Virus de la Jaunisse Nanisante de l'Orge, BWYV, "Soybean Dwarf Virus", le Virus de la Jaunisse Apicale du Pois, le Virus de la Jaunisse Modérée de la Betterave (VJMB), le Virus du Jaunissement du Navet, "Bean Leaf Roll Virus".

A côté de ces principaux membres de type luteovirus, un certain nombre d'autres virus sont regroupés, soit par leurs propriétés biologiques : "Carrot Red Leaf Virus", les agents du "Cotton anthocyanosis", "Filaree Red Leaf", "Physalis mild Chlorosis", "Strawberry mild Yellow edge", "Tobacco vein distorting", "Subterranean clover stunt", "Tomato Yellow top" et du "Turnip Latent".

Le virus de l'Enroulement de la Pomme de terre fait partie de cette liste d'attente : en effet, ses propriétés physiques semblaient jusque là différentes du groupe pour le classer définitivement.

SARKAR a mis en évidence en 1976 que le virus de l'Enroulement de la Pomme de terre contient une double hélice à ADN de poids moléculaire $0,56.10^6$ daltons. Dans une deuxième publication, cet auteur (abstract n° 8, août 1978 - Conférence de Munich) propose un poids moléculaire de $1,3.10^6$ daltons, pour l'acide nucléique de ce virus.

Ce n'est pas la première publication au sujet d'ADN contenu dans le génome des virus de plantes.

En 1968, SHEPHERD et al. ont montré que l'acide nucléique du virus de la Mosaïque du Chou "Cauliflower Mosaic Virus" ou CAMV, est à double hélice d'ADN.

KOJIMA et TAMADA (1976) ont rapporté que les constantes de sédimentation du VEPT et du SDV mesurées dans un gradient de saccharose sont très voisines.

Un travail similaire a été publié par KOJIMA et MURAYAMA (1972b).

Dans la présente étude, nous avons trouvé que le génome du virus de l'Enroulement de la Pomme de terre était constitué par un ARN monocaténaire de poids moléculaire de $1,9.10^6$ daltons et pas d'ADN.

En outre, des résultats ultérieurs obtenus dans le test ELISA nous montrent que le virus de l'Enroulement de la Pomme de terre ne se multiplie pas dans son vecteur puceron, ce qui confirme les conclusions de HARISSON (1958).

Contrairement aux résultats de STEGWEE D. et PONSEN M.B. (1958).

Egalement d'autres résultats qui seront discutés dans les prochains chapitres nous amènent à conclure que le virus de l'Enroulement de la Pomme de terre (génome à ARN, pas de multiplication virale dans son vecteur) doit être classé dans le groupe des luteovirus qui comprend le VJNO et BWYV (FALK B.M., DUFFUS J.C. and MORRIS T.J. 1977). Ces deux virus contiennent aussi une simple hélice d'ARN monocaténaire de poids moléculaire 2.10^6 daltons.

HISTOIRE

En 1886, MAYER aux Pays-Bas travaillait à une maladie grave du tabac qu'il appela "Mosaïque du Tabac". Il put reproduire la maladie en injectant du jus de plants de tabac infectés à une plante saine.

La contamination du jus réduisait après plusieurs heures à la température de 65° à 70° et disparaissait après quelques heures à la température de 80°c ainsi qu'après clarification et précipitation avec une solution faiblement alcoolisée.

Du fait qu'aucun champignon n'était présent sur la plante malade ou sur le jus filtré, il conclut que la Mosaïque du Tabac était probablement causée par une bactérie.

En 1891, IVANOWSKI remarqua une maladie du Tabac en Crimée, semblable à la Mosaïque étudiée par MAYER, cependant il ne fut pas d'accord avec lui.

Au filtre Chamberland la préparation d'IVANOWSKI était encore infectieuse, il pensa que ses résultats étaient dûs, soit à une toxine secrétée par la bactérie, soit à la pénétration de la bactérie à travers les pores du filtre.

On pensait alors que ces maladies inconnues étaient corpusculaires, mais on savait qu'elles étaient dues à des agents transmissibles mécaniquement ou par greffe.

Le premier à se séparer de la théorie corpusculaire pour l'étiologie de la maladie de la Mosaïque du Tabac fut BEIJERINCK (1898) qui conclut, après des expériences de diffusion sur l'agar, que la maladie n'était pas causée par des microbes mais par un "contagium vivum fluidum".

Il conclut également, d'une série d'inoculation, que la contagion se reproduisait dans la plante vivante. C'est aussi dans les travaux de BEIJERINCK que le mot Virus est employé pour décrire la contagion. Il trouva que le virus infectait et envahissait les jeunes tissus plus rapidement que les tissus adultes, se propageait tant dans le xylème que dans le phloème, était transmissible par greffe et capable d'infecter les plantes par les racines. Il rapporta également que le virus était encore infectieux pendant deux ans dans les feuilles sèches malades, qu'il survivait à l'hiver dans le sol et devenait inactif après exposition à la formaline ou après ébulition.

Pendant la période de trente années (1905-1934) de nombreux virus furent décrits relativement aux symptômes et aux moyens de transmission. Pendant cette période, le virus en tant qu'agent causal de maladies fut montré différent de la bactérie en bien des manières.

La première contribution importante vint en 1935 quand STANLEY obtint des cristaux de T.M.V.

Il trouva qu'un jus de plants de tabac infecté pouvait être fractionné avec du sulfate d'ammonium jusqu'à ce qu'une protéine cristalline fût obtenue.

Il put associer l'infectivité à une protéine cristalline et proposa que T.M.V. fût considéré comme une protéine autocatalytique qui exigeait, pour se multiplier, la présence de cellules vivantes.

L'année suivante, BAWDEN, (1935), BAWDEN et PIRIE (1938) montrèrent que les préparations cristallines liquides de T.M.V. consistaient en protéine et acide nucléique de type ribose et que les particules de virus étaient composés de sub-unités en forme de batonnets présentant le phénomène d'anisotropie. Immédiatement après 1936, de nombreuses publications furent faites caractérisant le virus par des méthodes physiques et chimiques.

Les premières études aux rayons X de BERNAL et FANKUCHEN (1941), démontrèrent que les particules de virus sont formées de subunités arrangées de manière régulière. Le microscope électronique - quoique découvert antérieurement - fut utilisé en 1939 par KAUSCHE et al. pour démontrer que les particules de virus associées à la Mosaïque du tabac sont de minces batonnets. Bien que la qualité des micrographies électroniques fût pauvre comparée aux modèles actuels, la morphologie d'autres virus fut étudiée par STANLEY et ANDERSON (1941).

On trouva quelques batonnets et d'autres virus de forme sphérique. L'usage du microscope électronique pour étudier la morphologie des particules de virus fut stimulée en 1945 quand WILLIAMS et WYCKOFF utilisèrent la projection de l'ombre pour améliorer les contrastes. La visualisation des virus à l'intérieur des cellules hôtes fut bientôt accomplie quand les techniques d'inclusion et de coupe fine furent améliorées.

La composition chimique du virus de la Mosaïque du Tabac a été étudiée en détail, l'importance pour l'infectivité de la portion d'acide nucléique du virus fut soulevée par EPSTEIN (1953) quand il montra que la portion radio-sensible du virus était l'acide nucléique et non la protéine.

Le traitement du virus au phénol par GIERER et SCHRAMM (1956) montra que la protéine pouvait être enlevée et que la partie d'acide ribonucléique de la particule était infectieuse. D'autres procédés (FRANNKEL CONRAT, 1956) ont été employés pour les études de déprotéinéisation du virus et quelques-uns des virus en batonnets ont été reconstitués. Ainsi, on considère maintenant que la plupart des virus consistent en un acide nucléique infectieux entouré d'un grand nombre de sous unités de protéines probablement toutes semblables. L'emploi de techniques de coloration négative (HALL, 1955), (BRENNER et HORNE, 1959) a grandement accru l'emploi du microscope électronique pour les études concernant la morphologie et la structure des virus. Ces études, associées à la cristallographie moderne, aux rayons X et aux données physicochimiques nous ont apporté quantité d'informations sur la nature des virus.

HISTORIQUE DU VIRUS DE L'ENROULEMENT DE LA POMME DE TERRE

Nous avons vu que la virologie est une science relativement récente dont les premiers pas furent effectués essentiellement avec le virus de la Mosaïque du Tabac.

La plupart des autres virus n'ont pas connu un approfondissement aussi rapide que celui du virus de la Mosaïque du Tabac, virus très concentré dans la plante et à l'extraction aisée.

Le VEPT fait un peu exception en raison des symptômes très caractéristiques des plantes infectées. Cette propriété a permis de le reconnaître très tôt et d'initier des recherches depuis de nombreuses années. Nous rappellerons les symptômes du VEPT, pour mieux apprécier la valeur historique des notations qui ont été faites dans le passé. En effet, d'autres maladies peuvent être confondues avec l'Enroulement Viral.

Les symptômes du VEPT dépendent de la souche de virus, la variété de Pomme de terre, des conditions de l'environnement, mais, en règle générale, ils peuvent se ramener à un type unique.

C'est la raison pour laquelle le symptôme principal donné par le virus, l'Enroulement des feuilles permet de le nommer.

Pour les autres virus de la Pomme de terre, on a préféré leur attribuer un nom sans relation directe avec les symptômes qu'ils occasionnent.

L'infection primaire du VEPT apparaît toujours au niveau des jeunes feuilles au sommet des plantes. Ces feuilles habituellement dirigées vers le haut prennent une coloration jaune pâle.

Quelques variétés se colorent en pourpre. La plupart des variétés présentent des feuilles enroulées, particulièrement celles de la base.

Les symptômes de l'infection secondaire sont toujours plus graves pour l'ensemble de la plante. Celle-ci présente un port érigé, son développement est réduit. Les plus anciennes feuilles sont enroulées et les feuilles du sommet sont plus pâle. Les feuilles de la base, en

Symptôme principal donné par le virus de l'Enroulement de la Pomme de terre ; sur la plante de Pomme de terre variété CLAUDIA.

particulier, se durcissent et se parcheminent, les plus anciennes virent au pourpre très prononcé. Chez quelques variétés les plus anciennes feuilles montrent une nécrose sévère.

Dans les régions tropicales on observe une jaunisse apicale de la plante. Les tubercules de certaines variétés réagissent en se nécrosant à l'intérieur.

L'Enroulement Violacé dû à mycoplasme se distingue assez bien, par la localisation sectorielle et apicale des symptômes et par la présence assez fréquente de tubercules aériens (COUSIN, 1975).

Le Rhizoctonia solani détermine un enroulement mou (ou faux enroulement) consécutif à la trachéomycose. Enfin une asphyxie des racines ne doit pas prêter à confusion, l'enroulement dans ce cas est temporaire et ne s'accompagne pas d'un durcissement des feuilles.

Une confusion possible peut être due à la présence de colonies de Macrosiphum euphorbiae, ce puceron détermine des enroulements du sommet de la plante. Mais la présence de ces pucerons et la localisation des symptômes permet de distinguer cette toxémiase de l'infection virale.

Une première notation européenne de l'Enroulement a été retrouvée par SALAMAN (1949) dans un ouvrage de Robert MAXWELL datant de 1751. L'observation de cette dégénérescence fut à l'origine d'un effort considérable pour isoler des clones indemnes de symptômes. C'est ainsi que MAXWELL écrit : "in Gallaway we find that potatoes for seed ... require changing not only from one ground but also from one country to another ...".

En France PARMENTIER note en 1781 (repris dans un ouvrage de 1789) l'existence de l'Enroulement en lui donnant les noms ambigus de FRISEE ou PIRVE.

L'existence relativement précose de ce virus chez les Pommes de terre importées du continent sud-américain au début du 17e siècle, pose le problème de l'origine de ce pathogène. On est tenté de répondre qu'il est arrivé avec la plante. Cependant l'observation de MAXWELL permet de penser que tous les tubercules n'étaient pas infectés. On peut supposer que le niveau de la contamination était fonction de la fréquence des vecteurs et de l'origine du matériel cultivé. Des éléments de réponse pourront peut-être apportés lorsque l'on saura comparer finement les génomes des souches américaines et européennes.

La nature infectieuse de l'Enroulement de la Pomme de Terre a été démontrée par QUANJER et al. (1916) à la suite de résultats obtenus par greffe. OORTWIJN BOTJES (1920), PAYS-BAS, SCHULTZ et FOLSOM (1921), U.S.A., ont mis en évidence la transmission de la maladie d'une plante à l'autre par le puceron Myzus persicae, SULZ. La visite de QUANJER en France, en 1920, fut suivie d'une prise de conscience des problèmes de dégénérescence de la Pomme de terre. De cette époque datent les premiers centres de sélection.

Les études sur le VEPT furent facilitées à partir de 1948 quand KIRKPATRICK découvrit que Physalis floridana Rydb. pouvait être utilisée comme plante test pour ce virus. Cette plante permet de réduire considérablement le temps de latence.

HEINZE K., en 1955 (ALLEMAGNE), montra qu'en injectant de l'hémolymphe de pucerons infectieux ou des extraits de plantes infectées à des pucerons sains, ceux-ci étaient capables de transmettre la maladie.

Ces résultats ouvraient la voie, en particulier, à l'étude des relations pathogène-puceron, l'épidémiologie de la maladie etc. C'est ainsi que HEINZE K., en 1955, montra qu'un puceron sain auquel on infectait de l'hémolymphe de puceron infectieux ou un extrait de plante infectée, était capable de retransmettre la maladie. Cette acquisition indirecte de l'agent pathogène par le puceron a été ensuite reproduite d'une manière élégante par ROCHOW en 1960. La méthode consiste à faire acquérir l'agent pathogène par un puceron sain à travers une membrane tendue de parafilm. Grâce à cette méthode on pouvait rechercher les conditions optimum pour l'isolement de cet agent pathogène.

On pouvait penser que ces deux éléments alors disponibles : plante sensible, test de pouvoir infectieux rapide, permettraient la découverte de l'agent infectieux dans un court délai. Il fallut cependant attendre encore une vingtaine d'années avant que le virus en cause, soit définitivement observé.

En effet, une bonne partie des travaux engagés pour la recherche de l'agent pathogène entre 1950 et 1980 fut assez négative. On ne les rappellera que très succintement.

BRANDENBURG en 1962 pensa avoir montré la transmission mécanique de l'acide nucléique du VEPT. Différents chercheurs tentent d'isoler l'agent infectieux. En particulier SPRAU (1952) observe des filaments dans des extraits de plantes infectées. MOERICKE et WOHLFAHAT-BOTTERMAN (1962) isolent des

particules bacilliformes dans les pucerons vecteurs.

DAY et ZAITLIN (1959) - A partir d'un extrait de P. floridana ayant subi un cycle de centrifugation différentielle, il ne fut pas possible de mettre en évidence au microscope électronique des particules caractéristiques d'un virus.

Une certaine excitation se manifesta quand BRANDENBURG (1962) rapporta que l'acide nucléique du V.E.P.T. pouvait être à A.D.N.

Il basait sa conclusion sur le fait que le jus pressé de plantes de Pommes de terre infectées développait une couleur bleue avec le test à la diphénylamine. Ces résultats furent en partie le point de départ de l'égarement de certaines recherches portant sur l'acide nucléique du virus.

En effet, SARKAR en 1976 pensa avoir montré que le virus de la V.E.P.T. contenait une double hélice d'A.D.N. de poids moléculaire $0,56.10^6$ daltons. En 1978, au congrès international de virologie de MUNICH, il affirma à nouveau que le V.E.P.T. contenait une double hélice d'A.D.N. mais dont le poids moléculaire était de $1,3.10^6$ daltons.

Cependant, dès 1967, PETERS en Hollande réussissait à isoler des particules à symétrie cubique à partir du vecteur de l'Enroulement, M. persicae. Ses travaux méritent d'être particulièrement mentionnés.

En effet, il eut à collecter des quantités très importantes de pucerons, en s'assurant que la souche utilisée n'était pas déjà porteuse d'un autre virus spécifique du puceron. La présence de particules virales chez des pucerons non virulifères est d'ailleurs reconnue actuellement comme fréquente chez les aphides, FRAVAL et LAPIERRE (1970). Des particules de taille voisine de celles décrites par PETERS étaient retrouvées par KOJIMA (1968) dans des extraits partiellement purifiés de P. floridina. Parallèlement, sur coupe ultrafine de plantes infectées (P. floridana, Datura Stramonium, Pomme de terre, ...) ARAI et aL (1969) et KOJIMA (1974) montraient la présence de particules à symétrie cubique dans les cellules phloémiques. Ces deux caractères : morphologie des particules et leur localisation dans la plante, rapprochaient fortement le V.E.P.T. du virus de la Jaunisse Nanisante de l'Orge (V.J.N.O.).

GIBBS, en 1969, proposait de classer ces deux virus dans un même groupe. Cependant, une première difficulté tenait au fait que le VJNO était un virus à ARN (BRAKKE et ROCHOW 1974), alors que le V.E.P.T.

était supposé être à ADN (SARKAR 1976). Une deuxième difficulté tenait à la transmission vectorielle. STEGWEE et PONSEN (1958) pensaient avoir montré que le V.E.P.T. se multipliait dans le puceron. HARRISON (1958) réalisait une série d'expériences qui lui permettaient de conclure à une non multiplication de l'agent pathogène dans un vecteur ; ROCHOW avait abouti à la même conclusion en ce qui concerne le VJNO (1969 a). Telle était donc la situation paradoxale dans laquelle on se trouvait en 1975 lorsque ce travail fut entrepris.

IMPORTANCE ECONOMIQUE

Du fait que beaucoup de plantes infectées par des luteovirus sont des plantes alimentaires de première importance, ces virus sont cause de pertes sévères, de dommages considérables en quantité et en qualité à l'économie mondiale.

Les Pommes de terre et les céréales qui sont attaquées par les virus de ce groupe sont cultivées dans presque tous les pays du monde comme aliments de base.

En France, parmi les virus qui atteignent les Pommes de terre, deux surtout sont responsables d'importantes pertes de production : le virus Y de la Pomme de terre et le virus de l'Enroulement de la Pomme de terre.

Aux U.S.A., au Canada, on a démontré que, selon la gravité du symptôme de l'Enroulement, les pertes de production peuvent varier de 65 à 95 p. 100.

Des études faites par G.E. KLOOSTERMAN sur les variétés VORAN et RECORD ont montré que chaque pour cent d'Enroulement au champ, réduisait la récolte de un demi pour cent. En 1978, le taux d'infection a été évalué en République Démocratique Allemande, sur la Pomme de terre de consommation, parmi les tubercules virosés (40 p. 100) on trouvait 51 p. 100 d'Enroulement.

Sur certaines variétés sensibles comme CLAUDIA, il n'est pas rare de trouver jusqu'à 95 p. 100 d'Enroulement.

L'effet global varie selon les variétés considérées mais aussi avec les dates de contamination.

Quand l'infection ne se manifeste qu'en fin de saison, la perte peut être négligeable mais si l'on plante un tubercule infecté l'année précédente la production du pied sera très faible.

Le virus de l'Enroulement en complexe avec des virus de type Mosaïque affecte la physiologie de la plante au point que le rendement en tubercule devient presque nul.

En outre il semble que les feuilles enroulées gorgées d'amidon sont plus sensibles au Mildiou de la Pomme de terre.

Pour ces raisons la maladie de l'Enroulement de la Pomme de terre est donc très grave. En France 290 000 hectares cultivés en Pommes de terre, produisent normalement 6,89 millions de tonnes, soit 2 à 3 milliards de recettes brutes. (Communication de la Fédération des producteurs de plants de Pommes de terre PARIS 1978).

Si l'on admet seulement une perte de 20 p. 100 due à cette maladie, on voit que le manque à gagner n'est pas négligeable. Par ailleurs, pour arriver à ne subir que des pertes moyennes de cet ordre, il a été nécessaire d'organiser tout un système de sélection sanitaire fort onéreux qui grève sensiblement le coût de cette denrée essentielle.

La lutte contre cette maladie peut s'envisager de deux façons, soit directement en luttant contre les vecteurs du virus, soit indirectement.

On a constaté dans les champs que les formes ailées et aptères de M. persicae sont responsables de la propagation du virus.

Quand il y a beaucoup de pucerons dans la nature la maladie est plus grave d'où perte de production.

L'usage contre les pucerons d'insecticides spécifiques aide donc la protection de la récolte, mais ces insecticides ne sont que très partiellement efficace puisqu'ils ne limitent que les contaminations de l'année. Le plus souvent l'agriculteur plante des tubercules déjà contaminés, cette lutte directe est donc inopérante. La lutte indirecte consiste à fournir à l'agriculteur des plants sains ou des variétés peu sensibles.

Dans ces deux cas la base essentielle pour la recherche d'un tel matériel consiste en la possession de méthodes de diagnostics fidèles et très sensibles.

Nous verrons dans cette étude comment une connaissance plus approfondie du virus de l'Enroulement peut aider à obtenir ou améliorer de telles méthodes de diagnostic.

C H A P I T R E I

M A T E R I E L et M E T H O D E S

A. ORIGINE DU VIRUS.

Nous avons utilisé un nombre important de tubercules infectés, provenant de la station de LANDERNEAU, Fédération Nationale des producteurs des plantes de Pomme de terre à St-Germain (FFPPT).

Ces tubercules ont servi à la fois de source d'inoculum pour les transmissions et de semence pour multiplier du végétal nécessaire aux purifications virales.

WEBBS (1952), MACKINNON (1965) ont mis en évidence des souches du VEPT. En particulier, WEBBS a séparé des souches en fonction des symptômes occasionnés sur P. floridana.

En utilisant l'inoculum constitué par les tubercules provenant de LANDERNEAU et St-Germain, nos essais de transmission à P. floridana indiquent que cette plante réagit d'une manière assez homogène. On peut donc considérer que nos essais ont porté sur un ensemble d'isolats assez voisins, au moins en ce qui concerne la symptômatologie sur P. floridana.

B. LES PLANTES ET LES CONDITIONS DE CULTURE.

- 9 variétés de Pommes de terre infectées ont été utilisées.

VARIETES	SENSIBILITE au VEPT (1)
OSTARA, CLAUDIA, CLAUSTAR, VIOLA ..	très sensible
KELTIA, ETOILE de LEON, KERPONDY ..	sensible
BINTJE, KROSTARIA	moyennement sensible

TABLEAU 2

(1) Extrait du bulletin des variétés de Pommes de terre, édité par l'I.N.R.A. (1977).

Les tubercules de ces variétés sont cultivés en serre à une température variant de 17 à 24° C. Un éclairage d'appoint (6500 LUX) est apporté l'hiver permettant de régulariser la photo période (16 heures) et d'améliorer l'expression des symptômes de l'Enroulement.

Chaque tubercule est mis à germer dans un pot de 14 cm rempli de terre stérilisée. A condition d'apporter des complèments d'éléments nutritionnels on peut effectuer deux à trois prélèvement de matériel végétal avant la mort de la plante.

C. ELEVAGE DES PUCERONS.

M. persicae fut le seul vecteur du VEPT utilisé. Son élevage a été effectué sur Chou chinois (BRASSICA PETSAI, BAILLEY) maintenu dans des cages à l'abri de contaminations.

D. TRANSMISSION APHIDIENNE.

1. De plante à plante.

Des pucerons non porteur de virus sont déposés au pinceau sur les germes de tubercules infectés. Quatre jours après, Ces pucerons sont prélevés et déposés sur les germes de tubercules sains à raison de 10 individus par tubercules.

Dans ces conditions après 3 - 4 jours de repas contaminants on obtient des lots de plantes parfaitement infectées. Après le repas contaminant, les tubercules sont traités au pirimor. G. (SOPRA) et mis en pot.

2. D'un extrait purifié à P. floridana.

Nous avons utilisé la méthode de ROCHOW et BRAKKE (1964) qui consiste à faire acquérir le virus à travers une membrane, de parafilm.

Le schéma ci-dessous montre le dispositif que nous avons fabriqué pour effectuer ce type d'expérience.

Les pucerons sains sont déposés dans une chambre (d) et s'alimentent à travers un parafilm correctement tendu :

(il faut pouvoir lire à travers la membrane).

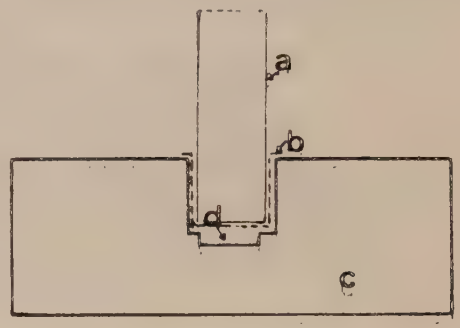
La solution nutritive proposée aux pucerons est constituée par du saccharose (10 p. 100) solubilisé dans de l'eau distillée à laquelle on ajoute le virus purifié dont on désire vérifier le pouvoir pathogène.

a . tube de plastique contenant la préparation virale.

b . membrane de parafilm tendue.

c . bloc de plastique.

d . chambre à pucerons.



(SCHEMA 1)

Après une journée d'acquisition les pucerons sont déposés sur des plantules de P. floridana. Une semaine plustard les pucerons sont tués par un traitement insecticide (Pirimor). Les symptômes notés dans le mois qui suit le dépôt des pucerons.

E. ISOLEMENT DU VIRUS.

1. les milieux d'extraction du virus.

Les tampons.

C'est essentiellement le tampon phosphate monopotassique disodique (tampon P) qui a été utilisé à PH 7,2 (produits R.P. TOUZART et MATIGNON).

La force ionique de ce tampon a varié suivant les expériences de 0,01 M (tampon P 0,01) à 0,6 M (tampon P 0,6).

à ce tampon peut être associé :

- le β mercaptoéthanol 0,3 p. 100 comme antioxydant.
- l'acide éthylène diamine tétracétique (sel disodique) EDTA Chelateur d'ions divalents, qui joue le rôle de clarifiant.

2. Les clarifiants.

a) Le mélange de KITANO. (KITANO et al. 1961)

Il nécessite la préparation d'un tampon phosphate monopotassique dipotassique 2,5 M pH = 7,2, ainsi qu'un mélange de butoxyéthanol éthoxyéthanol (1V/2V).

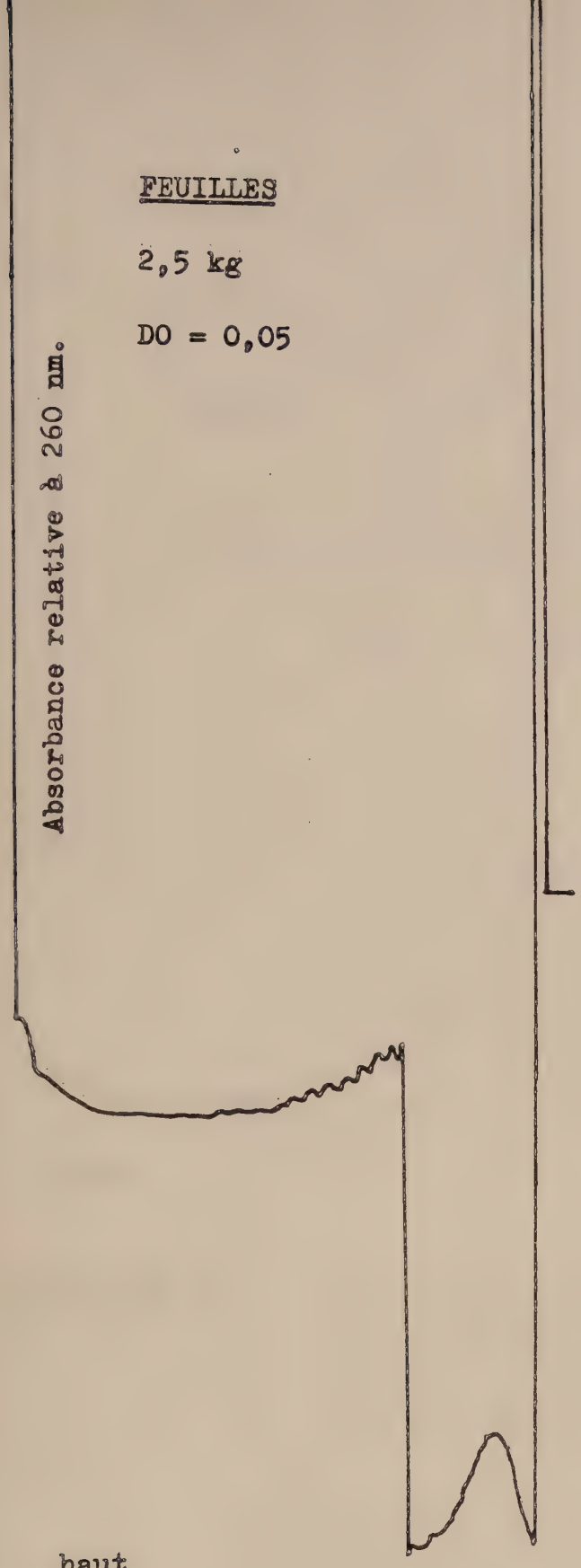
On mélange à 4°C l'extrait viral au tampon 2,5 M volume à volume, puis on ajoute 0,8 volume du mélange butoxy, éthoxyéthanol. Après avois agité quelques minutes, on sépare les phases par centrifugation (5 minutes à 5 000 g). Si le virus est présent, il se situe dans une interphase insoluble. Nous n'obtenons pas le VEPT avec cette méthode, ni par les plantes, ni par son vecteur. (GRAPHIQUE A, page 25-26).

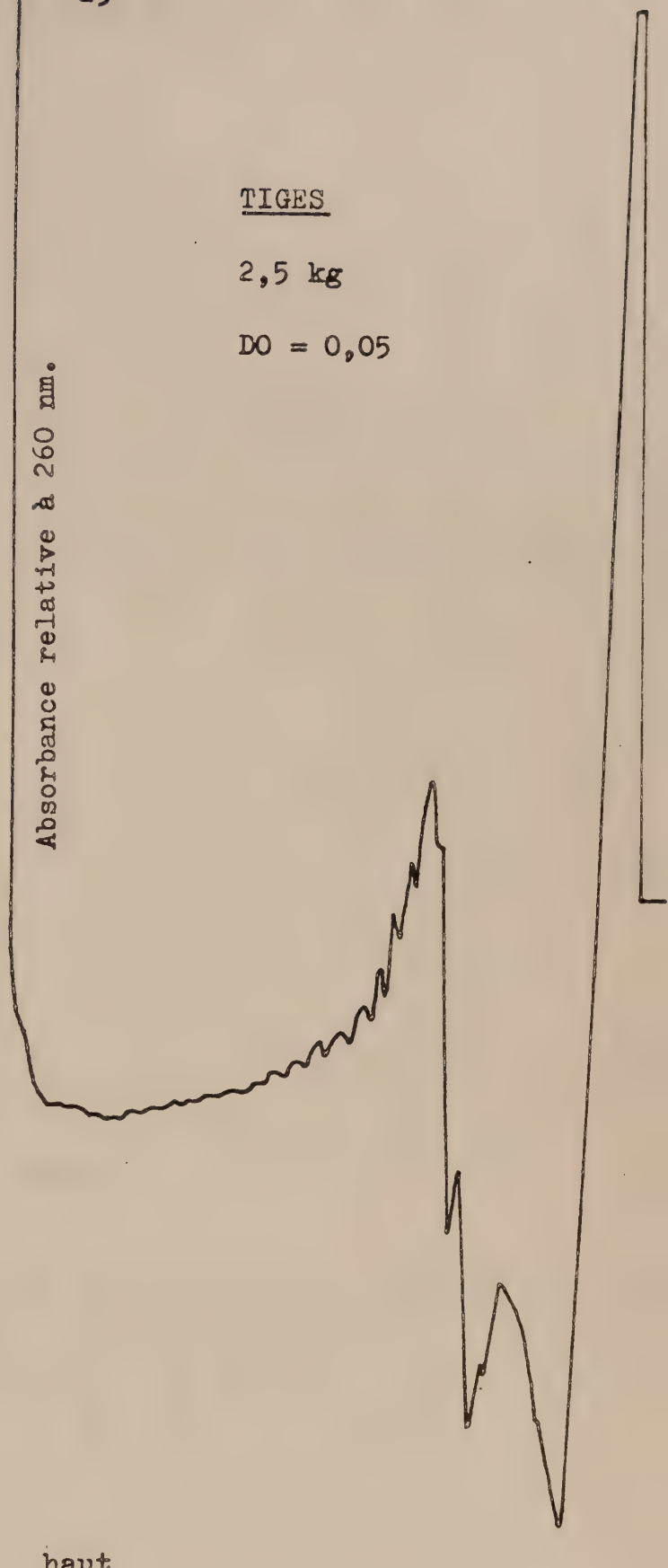
b) Le Fréon.

Le fluoro-carbone de type C_2 Cl_3 F_3 a été préconisé par KOJIMA (1974) comme clarifiant.
Ce produit, sous le nom commercial de DAIFON S_3 , a été employé sur des extraits partiellement purifiés.

c) Le butanol.

Le butanol (R.P. Prolabo) est utilisé essentiellement en début de purification. On s'assure de sa bonne répartition dans l'extrait de plante en agitant celui-ci. Le butanol froid est ajouté lentement dans un extrait, lui-même maintenu à 4°C.



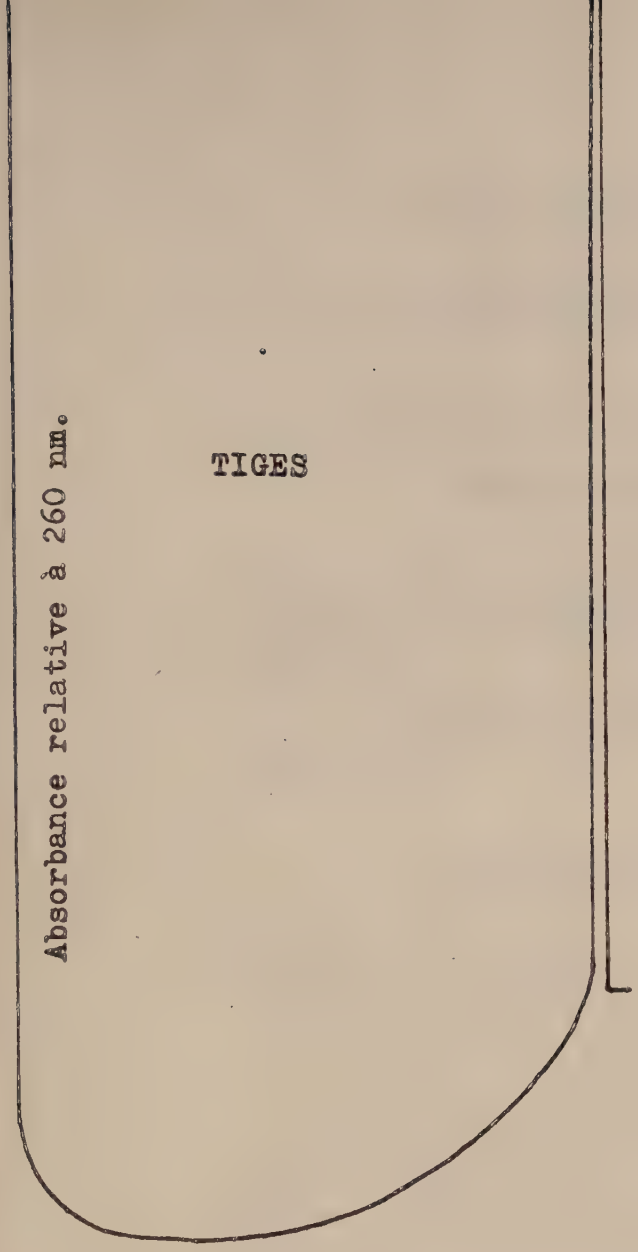


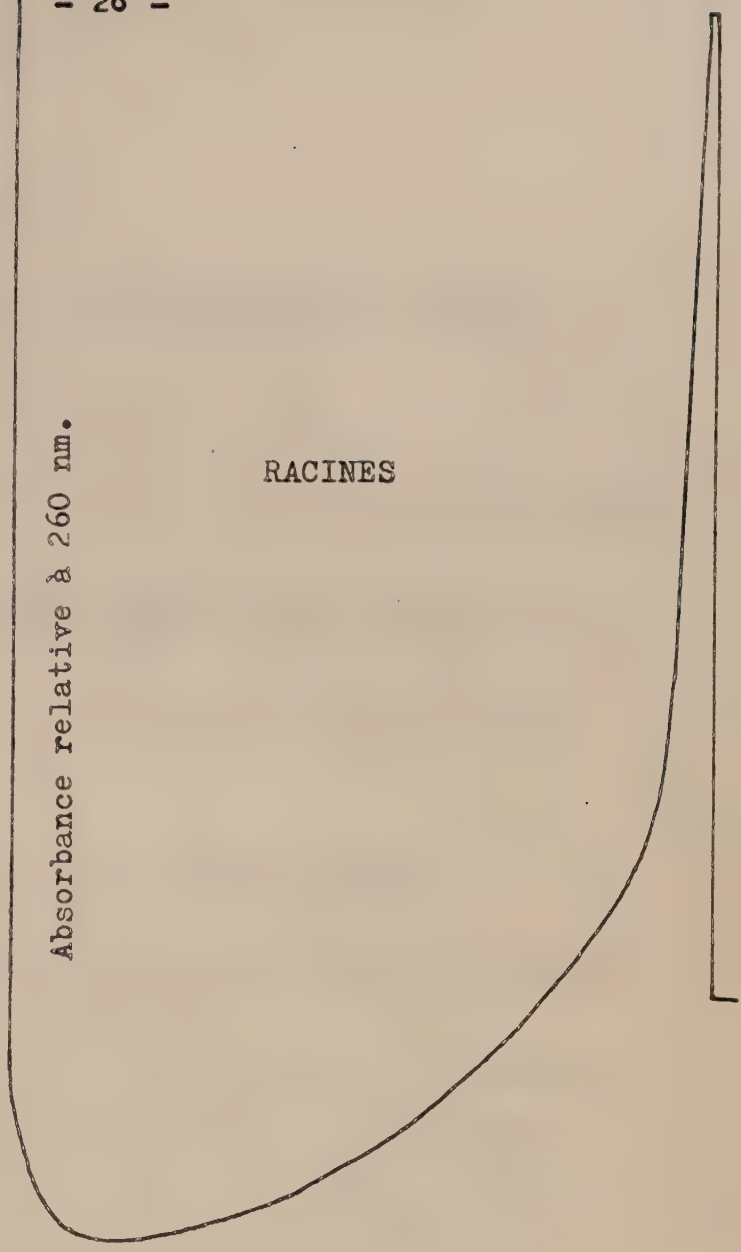
GRAPHIQUE A

PLRV KITANO méthode SW 41 55 minutes

40 000 RPM 5-20 p. 100 gradients de saccharose

0,6 ml/1,8 total DO 0,5 Ø cellule 0,5





GRAPHIQUE A

Purification du PLRV par la méthode de KITANO,
(Tiges et Racines, chaque : 2,5 kg).
Gradient de saccharose 5-20 p. 100 - SW 41 55'
0,6 ml/1,8 total - DO = 0,5 - Ø 0,5

d) Le chloroforme.

Le chloroforme (R.P. Prolabo) est utilisé dans les mêmes conditions que le butanol.

3. Concentration et purification du virus.

a) Précipitation du virus par le polyethylène glycol.

Pour l'ensemble des essais de purification réalisés on a concentré les extraits par le polyéthylène glycol de poids moléculaire 6 000 (PEG) (produit prolabo).

Suivant le type de purification des concentrations variables de Na Cl dans l'extrait contenant déjà le PEG.

b) Ultracentrifugations differentielles.

Les extraits partiellement purifiés sont soumis à des cycles d'ultracentrifugation différentielle : 40 000 tours minutes 2 heures, reprise du culot et clarification à 10 000 g 15 minutes.

Après les gradients de saccharose, les fractions à concentrer sont ultracentrifugées en deux temps.

La première ultracentrifugation est effectuée à 40 000 RPM, pendant quatre heures (concentration en sucre voisins de 10 p. 100). Après avoir éliminé les 3/4 de la partie haute du contenu du tube, celui-ci est rempli par du tampon P 0,01 et une deuxième ultracentrifugation à 40 000 RPM 3 heures est réalisée.

c) Gradients de saccharose.

Les gradients continus de saccharose sont réalisés par dépot de 4 souches successives de concentration allant de 20 à 5 p. 100 de saccharose. Après une nuit à 4° C des gradients approximativement linéaires sont obtenues. Lorsque l'on utilise les tubes du rotor SW 41 (BECKMAN) à godets horizontaux, les volumes de saccharose déposés sont de 2,6 ml pour chaque concentration.

La fraction virale apportée au-dessus de gradient est d'environ 0,5 ml. Les tubes sont ultracentrifugés 1 heure à 40 000 tours/minute, sans freinage.

L'analyse et la récolte des gradients s'effectue à l'aide d'un appareillage I.S.C.O (cellule U.V.).

d) Gradient de densité.

Des préparations virales sont mélangées aux sels suivants :

- chlorure de césium (0,470 g/g tampon)
- sulfate de césium (0,6 g/g tampon)
- formiate de cesium (0,5 g/g tampon)

Puis sont déposés dans un tube en polyallomère. Après 48 heures d'ultracentrifugation dans un rotor à godets horizontaux, le contenu des tubes est analysé dans un appareil de type I.S.C.O. (cellule U.V.).

F. ETUDE AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE.

Toutes les observations ont été réalisées à l'aide d'un microscope électronique (Philips A 300), une tension de 80 000 volts souvent utilisée.

- Particules purifiées.

A un volume d'une suspension virale dans un tampon P 0,01 on ajoute 3 volumes d'acide phosphotungstique 2 p. 100 neutralisé par la potasse (0,1 M). Les échantillons sont déposés sur des grilles fraîchement carbonnées.

- Les coupes ultrafines.

Le matériel de départ est constitué par des Pommes de terre de la variété "ETOILE de LEON" infectées ou saines. Des fragments de pétiole de 1 mm prélevés à l'aide d'un scalpel sont déposés successivement dans différents milieux, tous maintenus dans de la glace fondante :

Milieu de préfixation :

- 5 ml. de glutaraldéhyde à 25 p. 100 (produit MERCK pour microscope électronique)
- 5 ml. d'eau distillée

- 10 ml. de tampon cacodylate pH 7,2 (tampon C) fraîchement préparé contenant :

  - 4,28 g. de cacodylate MERCK
  - 8,4 ml. d'acide chlorhydrique
  - 100 ml. eau distillée.

Milieu de rinçage.

Après 2 heures de préfixation, 3 lavages d'une minute sont effectués avec un tampon $\frac{C}{2}$.

Milieu de fixation.

Les échantillons sont maintenus pendant 2 heures dans une solution contenant :

- 1 volume de tampon C
- 1 volume de tétraoxyde d'osmium à 4 p. 100

Un rinçage est enfin effectué dans les mêmes conditions que le précédent.

La déshydratation des échantillons est réalisée en utilisant des solutions de plus en plus concentrées d'éthanol : successivement 50, 70, 90, puis 100 p. 100.

Pour parfaire la déshydratation on plonge les échantillons dans l'acétone à 100 p. 100.

G. EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES.

Les acides nucléiques sont extraits des particules virales purifiées, en utilisant la combinaison de deux techniques basée sur l'emploi du laurylsulfate de sodium (SDS) et la protéinase K (SHEPHERD et coll. 1970. WYATT et KUHN 1977).

L'extraction est effectuée à 30° C dans un milieu contenant dans un millilitre :

50 à 100 µg de virus
0,02 M dithioerythrithol
0,15 M Na Cl
0,015 M EDTA
0,05 M Tris-CLH PH8
0,25 p. 100 SDS
0,5 mg protéinase K (BOEHRINGER)

Après 30 minutes d'incubation le mélange est traité deux fois avec un volume égal de phénol saturé, les phases aqueuses sont récupées après séparation des phases par centrifugation. Les deux phases phénoliques sont lavées avec de l'eau distillée. Les phases aqueuses sont rassemblées et après avoir apporté 1/10 de volume d'acétate de potassium 2 M, pH=5 on ajoute 2 volumes d'éthanol froid.

Après une nuit à - 20° C les acides nucléiques précipités sont concentrés par ultra-centrifugation (250 000 g 30 minutes), séchés sous vide et resolubilisés dans de l'eau stérile.

Environ 5 à 10 µg d'acide nucléique est ainsi obtenu à partir de 50 à 100 µg de virus.

H. DEGRADATION ENZYMATIQUE DES ACIDES NUCLEIQUES.

Les hydrolyses sont effectuées soit avec la désoxyribonucléase (ou DNAse) pancréatique de bovin (WORTHINGTON) soit avec la ribonucléase ou RNAse pancréatique de bovin (WORTHINGTON RAF) préchauffée à 100° C 5 minutes pour supprimer l'activité DNAse contaminante. Les hydrolyses sont effectuées dans 20 µl de milieu à 37° C pendant 45 minutes. Les milieux d'incubation contiennent :

Pour le traitement RNAse

0,3 à 1 µ g RNA
0,01 M Tris-HCl pH 7,4
1 m M EDTA
1 ng RNAse

Pour le traitement DNAse

0,3 à 1 µ g DNA
0,01 M Tris-HCl pH 7,4
0,01 M, Mg Cl2
1 m M EDTA
0,025 M, 2 β mercapto-éthanol
5 p. 100 glycérol
1 ng DNAse

I. ELECTROPHORESE DES ACIDES NUCLEIQUES.

L'analyse des acides nucléiques natifs ou hydrolysés a été effectuée à l'aide d'un appareil à électrophorèse en plaques verticales. (épaisseur 0,16 cm, longueur 15 cm) à pH 7,8 suivant la méthode décrite par DANNA et coll. (1973).

Les gels contiennent : 1 ou 1,5 p. 100 d'agarose
ou 2,5 p. 100 d'acrylamide avec 0,5 p. 100 d'agarose

La localisation des bandes d'électrophorèse est déterminée grâce à l'utilisation du bromure d'éthidium (SHARP et coll. 1973). La fluorescence des bandes est enregistrée sur un film de type polaroïd.

°°°°°°°°°°

J: IMMUNISATION

Le virus purifié (10 à 75 µg) est mis en suspension dans un tampon 0,01 P. On ajoute à cette préparation des quantités variables d'adjuvant complet de FREUND (Bio Mérieux), qui permet une stimulation du système immunitaire.

L'émulsion ainsi réalisée est injectée par voie intramusculaire à deux lapins (race européenne), suivant le protocole d'immunisation suivant :

		PRODUIT INJECTE		PRELEVEMENT DE SANG		
Temps semaines	nombre injections	VIRUS	adjuvant	Temps jours	mode	volume
0	n° 1	1 ml	1 ml			
2e	n° 2	1 ml	1 ml			
3e	n° 3	1 ml	0,8 ml	18e	oreille	1 ml
4e	n° 4	1 ml	0,5 ml	30e	oreille	1 ml
5e	n° 5	1 ml	0,25ml	40e	ponction cardiaque	50 ml

TABLEAU 3

Dosage des immunoglobulines du sérum.

Précipitation en "Ring test".

Différentes dilutions de sérum sont déposées à la pipette pasteur dans des tubes fins, dans lesquels on a préalablement déposé quelques cristaux de saccharose. Après solubilisation des cristaux, on ajoute doucement avec une pipette pasteur de l'antigène au niveau du ménisque.

Les tubes sont maintenus à 20° C et observés régulièrement pendant plusieurs périodes de 10 à 15 minutes.

Méthode immunoenzymatique de type ELISA "Enzyme linked immunosorbent assay".

Le principe de cette méthode, décrite pour la première fois par ENGVALL et PERLMANN (1971), est rappelé sur le schéma page suivante.

Les conditions précises dans lesquelles sont effectuées ces différentes opérations ont été reprises dans les travaux de VOLLER et coll. (1976) et CLARK et ADAMS (1977).

- Matériel.

1) PBS Tween
2) Tampon de fixation
3) Tampon substrat

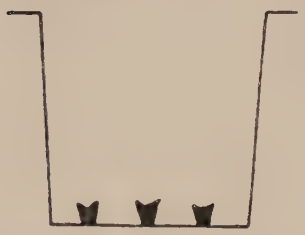
} composition des tampons plus bas

4) Polyvinyl Pyrrolidone (BDH chemicals) PM = 44 000
5) Ovalbumine (BDH chemicals)
6) Solution de NaOH : 3M
7) Plaques de microtitration en polystyrène M 29 AR (Dynatech)
8) Lecteur de plaques FLOW (Multiskan)

- Réactifs.

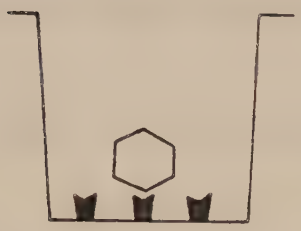
1) γ globulines purifiées et diluées dans le tampon de fixation des γ globulines
2) Enzyme couplée aux γ globulines, diluée dans le PBS Tween contenant 2 p. 100 de PVP + 0,2 p. 100 ovalbumine
3) Le substrat de l'enzyme : P - nitrophényl phosphate (Sigma)
4) Les échantillons à tester sont dilués dans le PBS Tween contenant 2 p. 100 PVP.

c) Principe de la technique du Test ELISA pour le virus de plantes :

1 

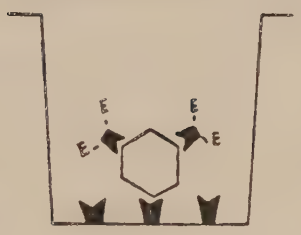
anticorps absorbés aux plaques

rinçage

2 

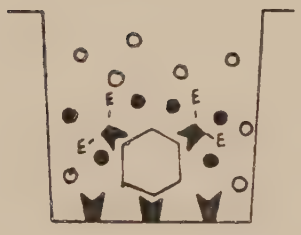
ajouter l'échantillon contenant le virus

rinçage

3 

ajouter l'enzyme liée aux anticorps

rinçage

4 

ajouter le substrat de l'enzyme

L'intensité de couleur suivant la concentration du virus.

SCHEMA 2

Les tampons :

1) PBS (pH = 7,4) : 8,0 g NaCl

tampon phosphate

0,2 g $KH_2 PO_4$
2,9 g Na_2HPO_4 12 H_2O
0,2 g KCl
0,2 g NaN_3

} préparé pour 1 litre

2) Tampon phosphate additionné de Tween 20 :

PBS + 0,5 ml de Tween 20 par litre.

3) Tampon de fixation pH = 9,6

1,59 g $Na_2 CO_3$
2,93 g Na H CO_3
0,20 g - Na N_3

} dans 1 litre d'eau de H_2O

4) Tampon substrat

97 ml diéthanolamine
800 ml d'H_2O
0,2 g NaN_3
pH ajusté à 9,8 avec HCl

} préparé pour un litre de tampon

Tous ces tampons contiennent 0,02 p. 100 d'acide de sodium comme agent antiseptique.

Les plaques de microtitrage sont en polystyrène de type M 29 AR, l'enzyme est la phosphatase alcaline EC 3.1.3.1. (type VII, Sigma chemicals). Le substrat : P nitrophényl phosphate (sigma chemicals) est utilisé à 0,67 ml dans le tampon substrat. Le substrat hydrolysé à été déterminé par mesure de l'extinction à 405 nm avec un spectro photomètre ;

- purification des γ globulines :

1 ml d'antisérum est dilué avec 9 ml d'eau distillée puis avec 10 ml de solution saturée de sulfate d'ammonium. On laisse pendant 30 à 60 mn, à la température du laboratoire, et ensuite le précipité est recueilli par centrifugation pendant 15 mn et dissout dans 2 ml de PBS dilué au 1/2.

On dialyse la solution obtenue trois fois contre 500 ml de PBS dilué au 1/2, les γ globulines sont séparées sur une colonne de DEAE cellulose (Whatman) prééquilibré dans le PBS dilué au 1/2.

On mesure sa densité optique (DO_{280}) et on ajuste la concentration des γ globulines à 1 mg/ml (DO à environ 1,4 à 280 nm). Les γ globulines sont conservées dans des tubes de verre traités au silicone à - 18° C.

- Conjugaison de l'Enzyme aux γ globulines :

5 mg d'une suspension phosphatase alcaline (SIGMA) sont centrifugés á vitesse lente dans une centrifugeuse Sorvall pendant 10 minutes. Le surnageant est jeté. Le culot, après évaporation de l'alcool est directement dissout dans 2 ml = 2 mg de γ globulines purifiées et dialysées largement trois fois contre 500 ml de PBS à 4° C (en chambre froide). On ajoute goutte à goutte ensuite une solution de glutaraldéhyde pour obtenir une concentration finale de 0,06 p. 100.

Le mélange est incubé à la température du laboratoire (22°C) pendant 4 heures.

Une couleur jaune-marron se développe habituellement.

Pour supprimer la glutaraldéhyde, on dialyse trois fois contre 500 ml de PBS, après addition de l'albumine bovine (5mg/ml final).

Le conjugué Enzyme - γ globulines est conservé à 4° C, En raison des variations de volume et des pertes possibles de γ globulines pendant le procédé de conjugaison, toute référence à l'utilisation des conjugués est en terme de dilutions du conjugué plutôt qu'en concentration absolue.

CHAPITRE II

PURIFICATION du VIRUS

De nombreux facteurs peuvent influer la réussite d'une extraction virale. Il faut choisir un hôte pour lequel le virus est suffisamment concentré et extrayable dans de bonnes conditions.

Par ailleurs, il faut respecter un certain nombre de conditions favorisant le maintien de la stabilité du virus tout en éliminant le plus possible les contaminants cellulaires.

Nous avons donc choisi la Pomme de terre essentiellement en raison de la quantité importante de matériel ne contenant que le VEPT dont on pouvait disposer. Ce choix tenait aussi au fait que les purifications antérieures obtenues à partir d'autres espèces telles Physalis floridana et Datura stramonium (KOJIMA 1969) (HEPS and ZOETEN G.A. 1978) ne permettaient que des rendements médiocres.

Nous avons cherché à comparer les concentrations virales dans les feuilles, tiges, racines. Mais, sachant que le virus était localisé au phloème pour chaque partie du végétal, nous avons comparé le contenu viral dans les fractions facilement extrayables au broyeur à hélice (épiderme, mésophylle, jeunes vaisseaux) et celles qui nécessitent un meilleur broyage (tissus conducteurs agés).

Parallèlement nous avons analysé les possibilités des différentes méthodes de purification connues en virologie : en faisant varier les tampons d'extraction et les clarifiants.

Enfin, on a recherché les conditions optimum de concentration du virus.

Dans une phase préliminaire nous avons utilisé comme matériel végétal le résidu obtenu après filtration d'un extrait de tiges passées au broyeur à hélice.

Ce matériel est broyé finement à l'azote liquide avant d'être homogénéisé dans différents milieux. En effet des expériences prélinimaires nous ont montré que les tiges étaient riches en virus et que le broyage à l'azote liquide en favorisait la libération.

Le TABLEAU 4 résume les différentes étapes de la purification du virus. C'est donc à partir de ce modèle que nous avons cherché à modifier un certain nombre de facteurs.

De l'enregistrement du profil du gradient de saccharose on peut calculer la surface couverte par la fraction virale. La mesure de cette surface permet de comparer l'efficacité relative de différentes méthodes de purification.

TABLEAU 4

1	Broyage au Waring Blender de la poudre végétale dans un tampon phosphate pH 7,2 de molarité variable contenant 0,3 p. 100 de β mercaptoethanol (2 volumes par poids).
2	-a. Agitation à 4° C, 15-30 minutes, de l'extrait en présence de 1/2 volume par volume de chloroforme. -b. Agitation à 4° C, 15-30 minutes, mélange de 1/2 volume de chloroforme plus 8 p. 100 de butanol. -c. Agitation à 4° C, 15-30 minutes, de l'extrait en présence de 1/2 volume du mélange chloroforme + butanol (1/4 + 1/4 V/V)
3	Séparation de la phase aqueuse par centrifugation (6000 g 15 minutes)
4	Ultracentrifugation de la phase aqueuse (100 000 g 2 h
5	Le culot d'ultracentrifugation est repris dans un tampon 0,01 M phosphate pH 7,2
6	Agitation à 4° C 10 minutes de l'extrait en présence d'un 1/2 volume de chloroforme
7	Séparation de la phase aqueuse par centrifugation
8	Ultracentrifugation de la phase aqueuse (160 000 g 2 h
9	Reprise du culot dans 1 ml de tampon phosphate 0,01 M pH 7,2 et clarification de l'extrait
10	Analyse en gradient de saccharose de l'extrait

A. EFFET DE LA FORCE IONIQUE.

Cet essai a porté sur des échantillons de 250 g de résidu de tiges broyées pour le TABLEAU 5, la comparaison des surfaces correspondant aux fractions virales du gradient de saccharose, permet de conclure que l'on doit préférer les forces ioniques élevées.

Pour les différentes parties de plantes, nous avons utilisé, pour avoir de meilleurs résultats, les différents tampons P 0,1 M - 0,3 M - 0,5 M - 0,6 M.

Nous détenons de meilleurs résultats avec le tampon P - 0,5 M broyé avec azote, pour le matériel sans broyage avec azote, ce tampon est aussi plus efficace.

Les tampons 0,1 M - 0,3 M pour première extraction sans broyage avec azote, ni congélation, nous n'obtenons pas de virus. Mais, par contre, tampon 0,6 M. pour la première purification sans azote, ni congélation est mieux que les tampons 0,1 M - 0,3 M. Mais pour la deuxième et troisième extraction n'est pas efficace.

TABLEAU 5 Effet de molarité du tampon d'extraction sur la quantité de virus extrait. (surface des pics de gradients de saccharose unité arbitraire).

MOLARITE	0,1	0,3	0,5
Quantité de virus	12	30	45

B. L'EFFET DE L'EDTA.

L'EDTA a été utilisé par un certain nombre d'auteurs pour clarifier les extraits de plantes.

Nous avons pu effectivement observer l'efficacité de ce chélateur, sur des extraits de Pomme de terre.

L'extraction est réalisée avec phosphate tampon molarités variables : 0,1 M - 0,3 M - 0,5 M 0,6 M contenant EDTA 0,01 M - 0,015 M et 0,001 M.

Les reprises des culots précipitation PEG 8 p. 100 et d'ultracentrifugation sont effectuées dans un phosphate tampon 0,01 M contenant 0,001 M EDTA.

Nous avons donc comparé des extractions du VEPT, tampon phosphate avec et sans EDTA en concentration variable, avec la même molarité que ci-dessus, ainsi que pour les reprises des culots.

Les résultats consignés sur le tableau 6 montrent que le rendement en virus est meilleur en présence d'EDTA, sans que l'amélioration apportée soit considérable.

Cependant on observe que les extraits sont beaucoup plus clairs.

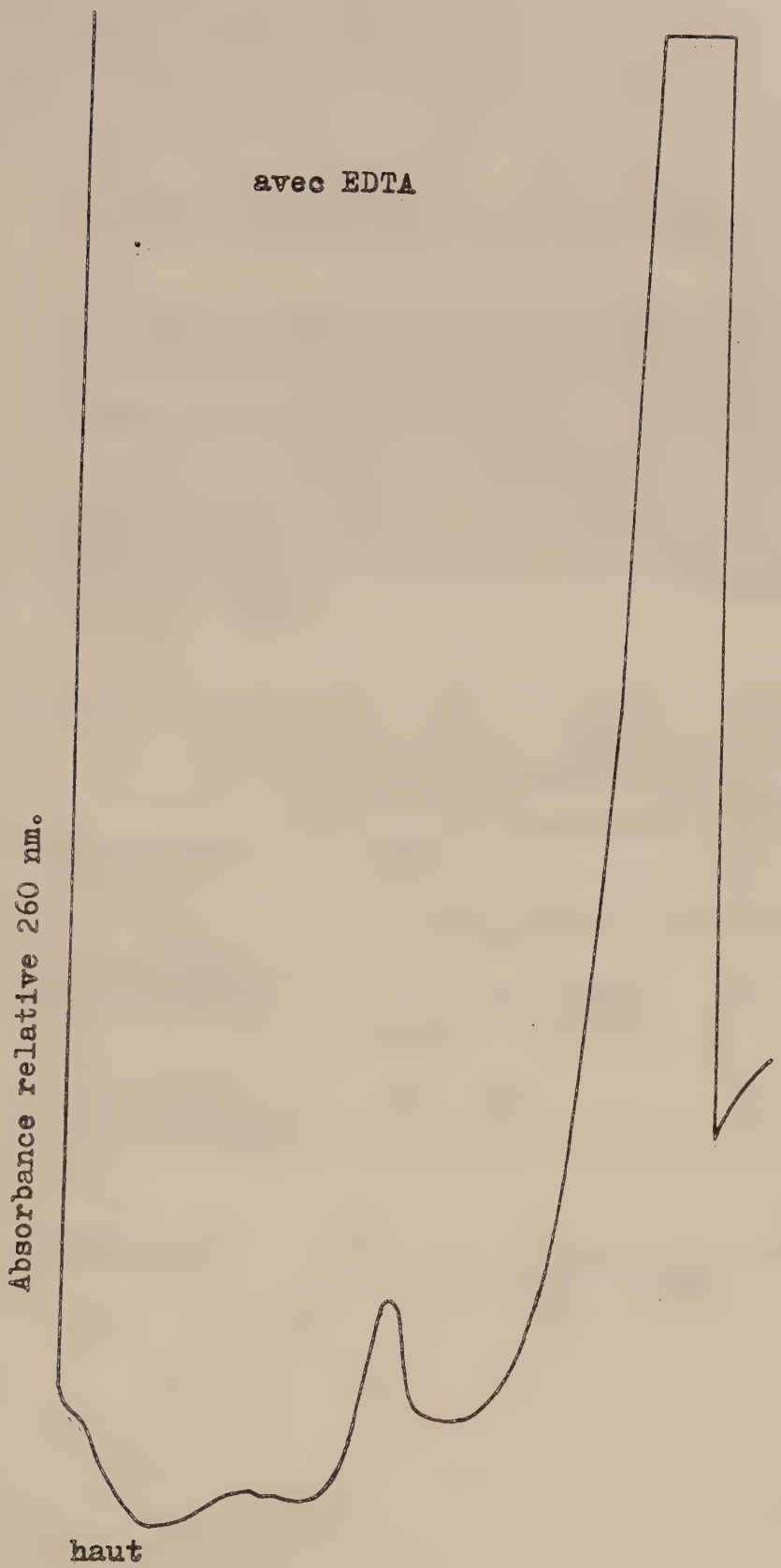
Les contaminants que l'on peut déceler lors de l'analyse en gradient de saccharose sont en quantité réduite. (graphique 1).

TABLEAU 6 Influence de la concentration en EDTA sur le rendement de l'extraction du VEPT.

	CONCENTRATION EN EDTA			
	0	M = 0,01	M = 0,015	M = 0,001
Quantité de virus	23	33	30	31

GRAPHIQUE 1
sans EDTA

Analyse en gradient de saccharose d'extrait partiellement purifié du VEPT.



GRAPHIQUE 1
Avec EDTA

Analyse en gradient de saccharose d'extrait partiellement purifié du VEPT.

C. EFFET DU BUTANOL ET DU CHLOROFORME

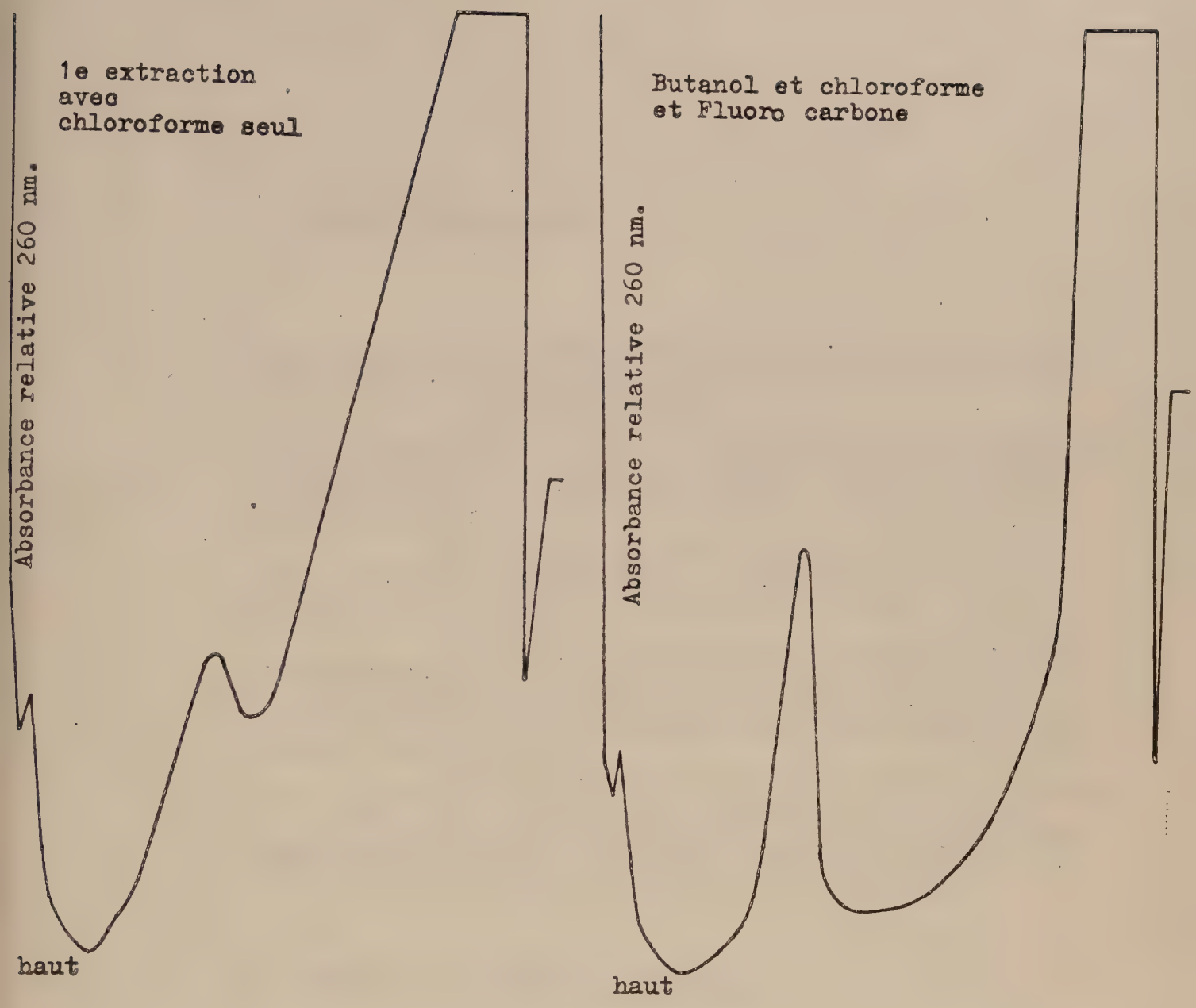
Les extraits de plantes sont maintenus en chambre froide et agités pendant 15 - 30 minutes, en présence d'un ou des deux agents clarifiants.

On arrête ensuite l'agitation et la phase aqueuse est séparée par centrifugation.

Avec du chloroforme et du butanol 1/4 V/V, on obtient un meilleur rendement et une bonne propreté de l'extrait qu'avec le chloroforme seul, (TABLEAU 7), (GRAPHIQUE 2). Le butanol peut être utilisé à des concentrations supérieures pour les nucléoprotéines sans enveloppe.

	Volume apporté par rapport au volume de l'extrait	Quantité de virus extraits	Propreté des extraits
Chloroforme	V/V	10	mauvaise
Chloroforme plus butanol	V/V 8 p. 100 final	12	faible
Chloroforme plus butanol	1/4 V/V	30	mieux

TABLEAU 7 Influence du butanol et du chloroforme sur la purification du VEPT.



GRAPHIQUE 2 Comparaison chloroforme seul (425 g)
et chloroforme butanol plus fluoro carbone (425 g)

D. EFFET DU FREON 113.

Le fluorocarbone est préconisé pour traiter les préparations des virus par (PHILIPSON 1967) et KOJIMA 1972) et les autres auteurs.

Nous avons effectué des essais de clarification par le Fréon 113 pour la phase 4 de la purification qui consiste à concentrer la fraction virale. Soit par utracentrifugation (TABLEAU 4) soit par précipitation par le PEG PM 6000.

Nous avons comparé l'effet du Fréon 113 (1/2 volume par volume à 4° C pendant 3 minutes), et du chloroforme (1/2 volume par volume à 4° C pendant 3 minutes). (GRAPHIQUE 2).

Le Freon s'est avéré le meilleur clarifiant particulièrement pour les fractions très contaminées 1r et 2e broyages de feuilles). Par contre sur des extraits de tiges le chloroforme est aussi efficace pour éliminer les impuretés.

Nous n'avons pas retenu ce produit en raison de sa toxicité considérable et sa grande volatilité.

Par ailleurs lorsque l'on laisse agir trop longtemps le Freon, le virus est fortement dégradé, ce qui n'est pas le cas en présence du chloroforme.

E. EFFET DE LA FINESSE DE BROYAGE.

Le virus étant localisé au phloème de la plante, son extraction nécessite l'ouverture des cellules de ce tissu.

Nous avons pu montrer l'importance du broyage en soumettant un extrait de tiges à une succession de traitements à l'azote liquide.

Plus de fibres avec moins de mésophylle après première extraction sans azote et aussi broyage très fins des fibres avec azote liquide donne un très

bon résultat pour obtenir les virus.

Les tiges de Pommes de terre cassées dans un broyeur à hélice (Waring blender) suivant le schéma déjà décrit (TABLEAU 4).

Le résidu retenu sur étamine est soumis à un broyage à l'azote liquide, dans un mortier prérefroidi.

Après une nouvelle reprise de cette poudre par le tampon d'extraction, le nouveau résidu retenu sur étamine est à nouveau soumis à un traitement par l'azote liquide. (illustration A, B, fin de chapitre. Le TABLEAU 8 récapitule les résultats obtenus sous forme de surface couvrant les pics de virus et enregistrés lors de l'analyse des gradients de saccharose.

			surface de la fraction virale
A	extraction	: sans azote liquide :	5
B	1e extraction	: avec azote liquide :	50
C	2e extraction	: avec azote liquide :	35
D	3e extraction	: avec azote liquide :	5

TABLEAU 8 Effet de l'importance du broyage sur l'extraction du virus. (Tampon 0,5 M phosphate).

Bien que l'on observe un effet apparent considérable de l'azote liquide, on peut imaginer que seule la resolubilisation successive du résidu est responsable de cette libération du virus.

Cependant si l'on broye le résidu de A, soit à l'aide d'un broyeur à hélice soit dans un mortier avec de l'azote liquide, on obtient les résultats consignés au tableau 9.

La finesse du broyage joue bien un rôle important sur la quantité de virus extrait.

Devenir d'une fraction au stade A	Surface de la fraction virale
TABLEAU 8	
Extraction azote	50
Waring blender	5

TABLEAU 9 Importance du type de broyage sur l'extraction du virus, bien que l'azote liquide permette une bonne solubilisation du virus, nous n'avons pas d'indications sur une éventuelle dégradation possible du virus isolé par cette méthode.

F. CONCENTRATION DU VIRUS (utilisation de PEG 6 000)

En 1963 HEBERT, montra qu'il était possible d'insolubiliser les virus des plantes par le polyéthylène-glycol. De nombreux auteurs ont appliqué cette méthode pour les bactériophages et virus des animaux.

KOJIMA 1972 et aussi d'autres auteurs ont utilisé le PEG pour précipitation du VEPT.

Les faibles concentrations de virus avec les plantes infectées nécessite l'emploi de quantités importantes de matériel végétal, par conséquence de gros volumes de tampons phosphate sont employés. Nous avons donc utilisé le PEG 6000 pour concentrer les fractions virales et éviter aussi les ultracentrifugations longues et couteuses.

Ces essais ont porté sur des extraits avec différentes molarités de tampons phosphate (PEM) :

a) avec le tampon phosphate 0,1 M ayant atteint le stade 3 (TABLEAU 4) après avoir ajouté du Cl Na (0,5 M final) on apporte des concentrations variables de PEG 6000, 2 p. 100 - 6 p. 100 - 8 p. 100 - 10 p. 100 -

Après deux heures d'agitation à 4° C, les extraits sont portés à 20° C pendant une heure avant d'être centrifugés.

b) les mêmes concentrations de PEG sont ajoutés sur les extraits avec d'autres tampon PEM (forte molarité) et agité pendant 1 heure, puis porté à 20° C pendant 1 heure avant centrifugation.

En effet en présence de forte molarité on observe souvent des cristallisations de sel, lorsque les extraits sont maintenus à une température inférieure à 10° C.

Lors des purifications ultérieures, nous avons donc employés une précipitation fractionnée. Après avoir éliminé le précipité 2 p. 100 on ajoute 6 p. 100 de PEG. Le précipité formé est concentré par centrifugation et constitue la fraction virale qui sera ultérieurement purifiée. (GRAPHIQUE 4)

C'est en présence de 8 p. 100 PEG avec tampon PEM de forte molarité que l'on obtient meilleure précipitation de virus (TABLEAU 10) (GRAPHIQUE 3)

Concentration en PEG	Quantité de virus extraits
2 p. 100	0
6 p. 100	20
8 p. 100	32
10 p. 100	30

TABLEAU 10 Influence de la concentration de PEG sur la précipitation du VEPT.

1 . Le virus est très résistant à de nombreuses molécules agressives pour d'autres virus :

- butanol à une concentration supérieure à 8 p. 100
- fréon au moins pendant de courtes périodes. (3 minutes).
- EDTA à de fortes concentrations.
- Force ionique élevée (0,5 M phosphate de sodium et de potassium).

2 . Le virus est très difficile à dégager du matériel végétal probablement à cause de son association à des cellules ou à des fragments de cellules phloemiques.

Ces résultats nous ont permis de proposer un schéma de purification (TABLEAU 11) que nous avons appliqué à la purification de virus compris dans différents compartiments de la pomme de terre : tiges, racines, feuilles.

Les résultats rassemblés au tableau 12 indiquent :

a) que l'on peut extraire ainsi le virus des feuilles (GRAPHIQUE 6) et des racines, (GRAPHIQUE 8).
b) la concentration du virus dans ces deux parties de la plante est plus faible que dans les tiges apparemment. (GRAPHIQUE 3 et 4).

c) C'est à partir des feuilles qu'il est le plus difficile d'extraire le virus.

.....

1. Broyage du végétal au waring blender dans un tampon phosphate 0,5 M contenant 0,3 p. 100 de β mercaptoethanol, et 10^{-2}M EDTA (2 volumes par poids) (tampon PEM).

2. Passage du broyat sur étamine.

Résidu 1	Fraction soluble
Broyage à l'azote liquide	S_1
Reprise dans le tampon PEM	
Passage sur étamine	

Résidu 2	Fraction soluble
Broyage à l'azote liquide	S_2
Reprise du tampon PEM	
Passage sur étamine	

Résidu 3	Fraction soluble
	S_3

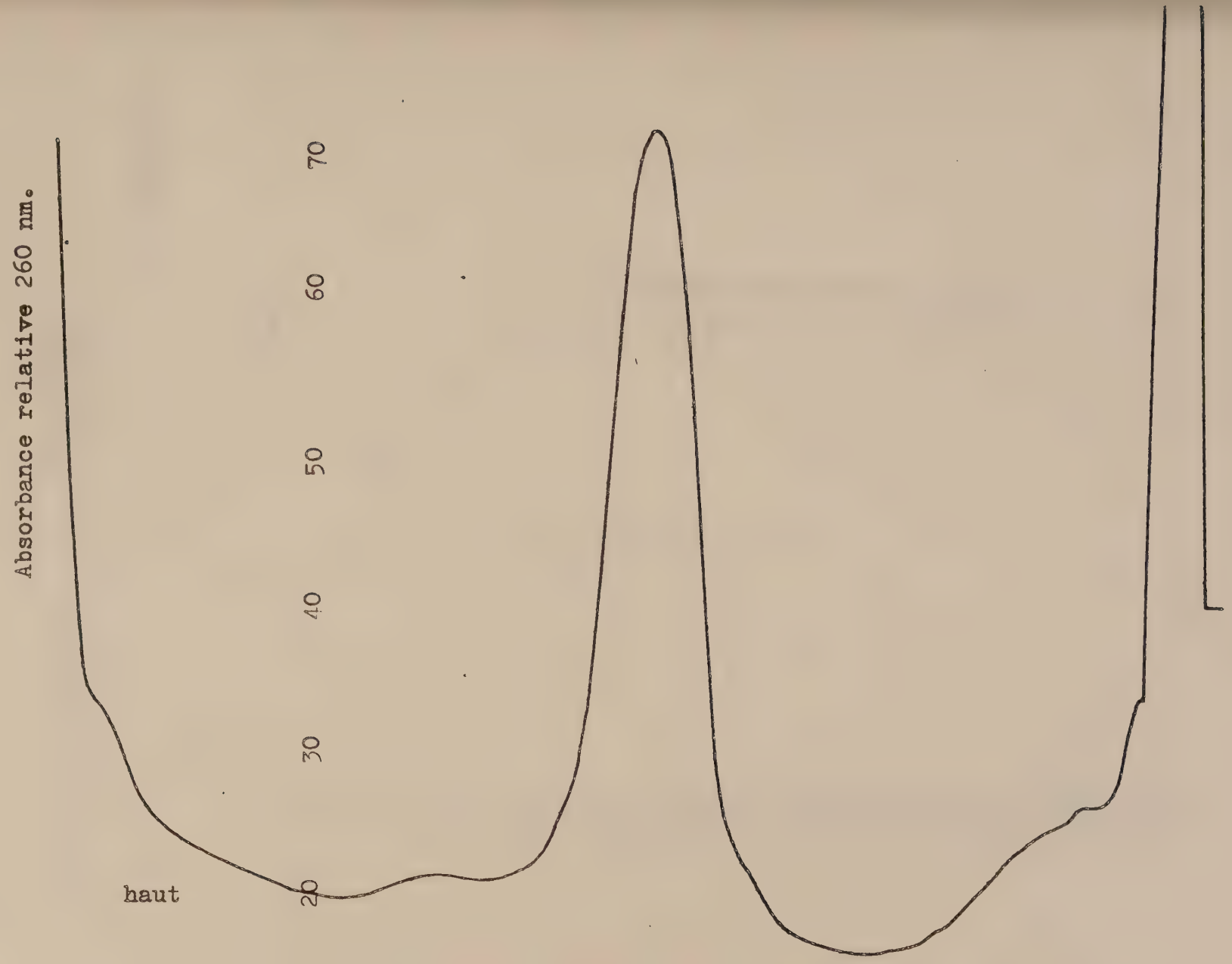
3. Traitement au butanol (1/4 V/V) chloroforme (1/4 V/V)

4. Concentration par le PEG, REPRISE PAR CULOT dans M = 0,01 PEM et clarification de l'extrait.

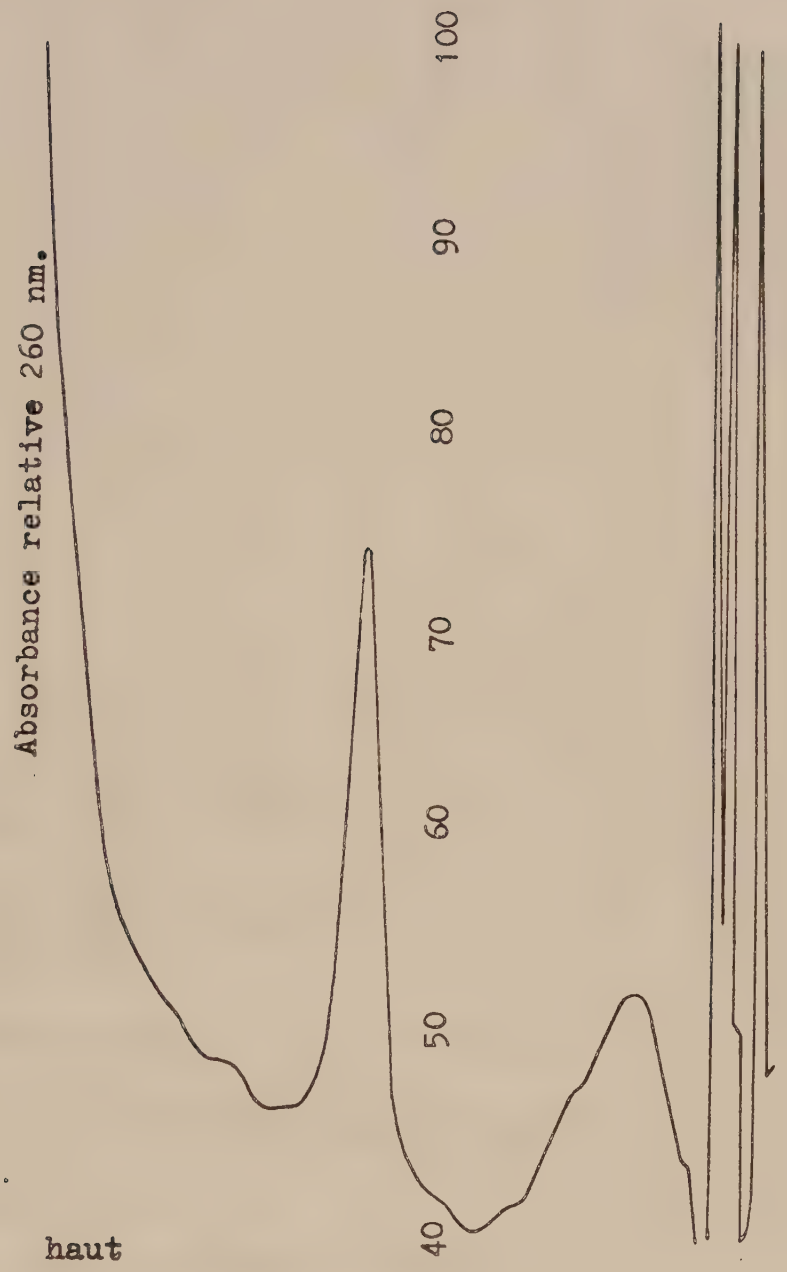
5. Ultracentrifugation

6. Caractérisation du virus en gradient de saccharose

TABLEAU 11 Schéma de purification du VEPT à partir de feuilles, racines et tiges de Pomme de terre.



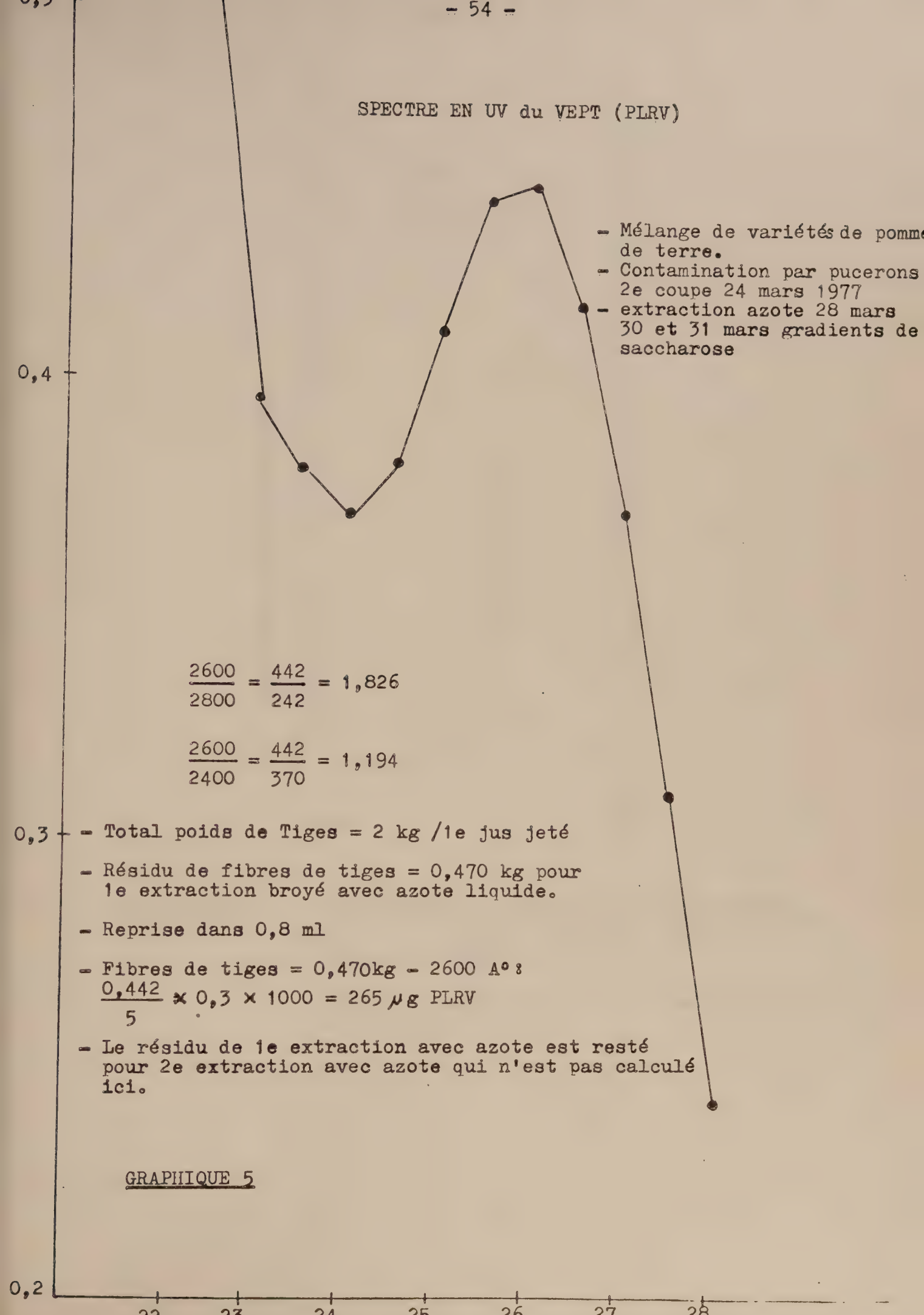
GRAPHIQUE 3 Extraction du VEPT à partir de 470 g de fibres de tiges, (2e coupe de plantes)
(Suivant le schema du tableau 10).
PEG 8 p. 100 - clarifié par Fluoro carbone - gradient de sucrose 5-20 %
SW 41 - 40 000 RPM 60' - Ø 1 cm - DO = 0,5



GRAPHIQUE 4

Résidu de l'extrait de Pomme de terre après extraction suivant le protocole du schéma (TABLEAU 11).

SPECTRE EN UV du VEPT (PLRV)

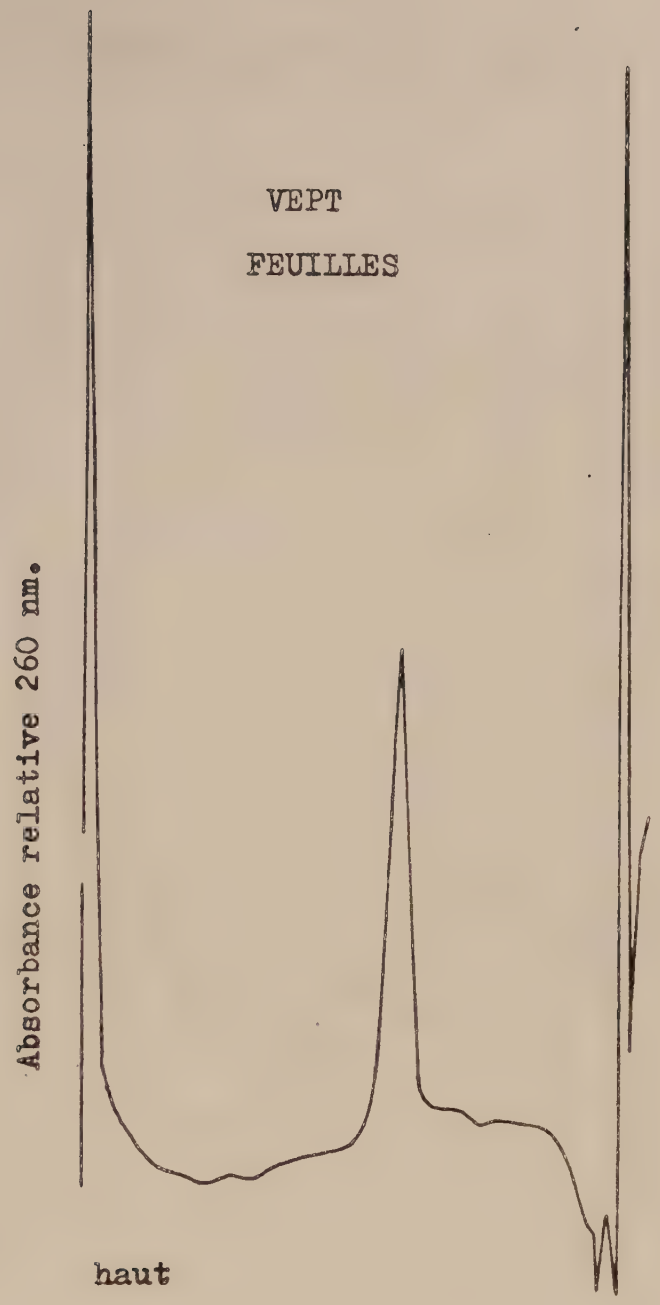


$$\frac{2600}{2800} = \frac{442}{242} = 1,826$$

$$\frac{2600}{2400} = \frac{442}{370} = 1,194$$

- Total poids de Tiges = 2 kg /1e jus jeté
- Résidu de fibres de tiges = 0,470 kg pour 1e extraction broyé avec azote liquide.
- Reprise dans 0,8 ml
- Fibres de tiges = 0,470kg - 2600 A° :
  $\frac{0,442}{5} \times 0,3 \times 1000 = 265\ \mu g$ PLRV
- Le résidu de 1e extraction avec azote est resté pour 2e extraction avec azote qui n'est pas calculé ici.

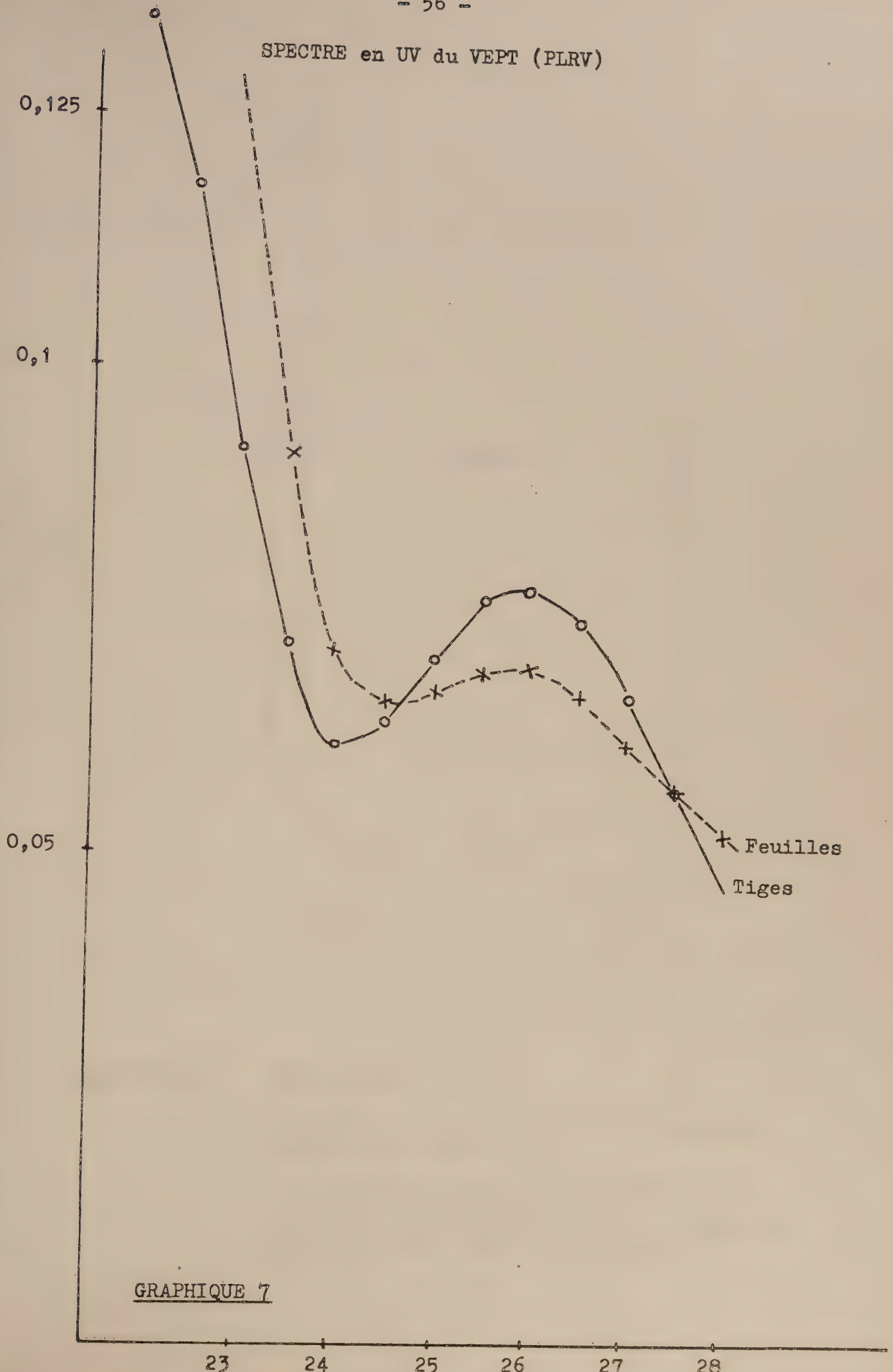
GRAPHIQUE 5



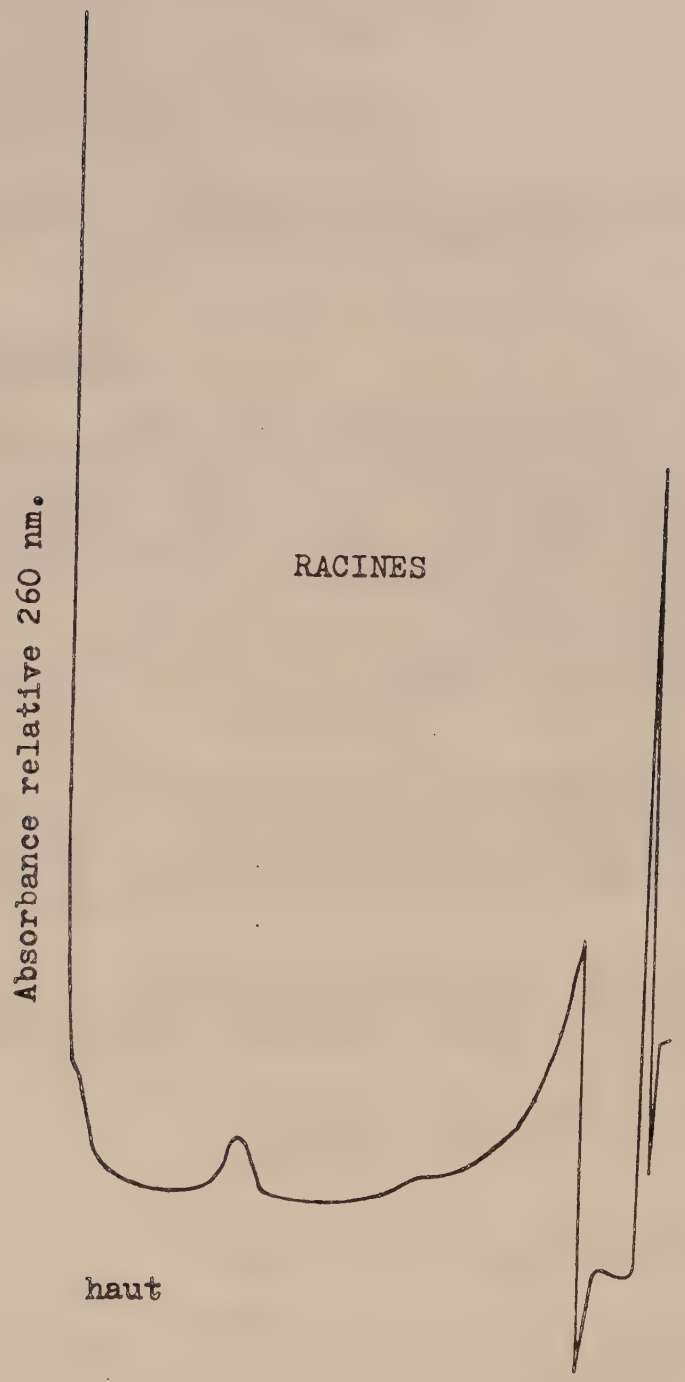
GRAPHIQUE 6 Purification du VEPT à partir de feuilles les 1r et 2e jus d'extrait de feuilles sont jetés, le résidu est purifié suivant le schéma du TABLEAU 11.

Analyse en gradient de saccharose 5-20 p. 100
SW 50 - 45' - DO = 0,5

SPECTRE en UV du VEPT (PLRV)



GRAPHIQUE 7



GRAPHIQUE 8 (Fraction S2)

Racines de la Pomme de terre (Total poids échantillons 300 gr).

La séparation du virus est effectué dans un gradient de saccharose 5-20 p. 100 après une ultracentrifugation de 60 minutes à 40 000 t/min. dans un rotor SW 41.

Matériel	S1	S2	S3
racines	0	20	-
tiges	5	65	35
feuilles	0	0	20

TABLEAU 12 Essai de purification du VEPT suivant le protocole du TABLEAU 10.

G. CONCLUSION.

La purification du virus de l'Enroulement de la Pomme de terre est possible à partir de la Pomme de terre. Les échecs antérieurs tenaient en fait que les études portaient sur l'ensemble du végétal. Pour nos purifications nous avons choisi les tiges, qui constituent la plus riche partie en virus de la plante.

Les extraits de feuilles en contiennent peu et pour l'isoler il faut se débarrasser d'une importante quantité de contaminants libérés à travers les fractions solubles S_1 et S_2 (TABLEAU 12)

Si les racines contiennent une quantité non négligeable de VEPT (GRAPHIQUE 8) leur utilisation comme source de virus est délicate. En effet il est difficile de séparer les racines de plantes du substrat qui les environnent.

Aussi le TABLEAU 13 de purification du virus que nous proposons ne tiendra compte que des tiges et s'inspirera des résultats obtenu de la façon suivante*:

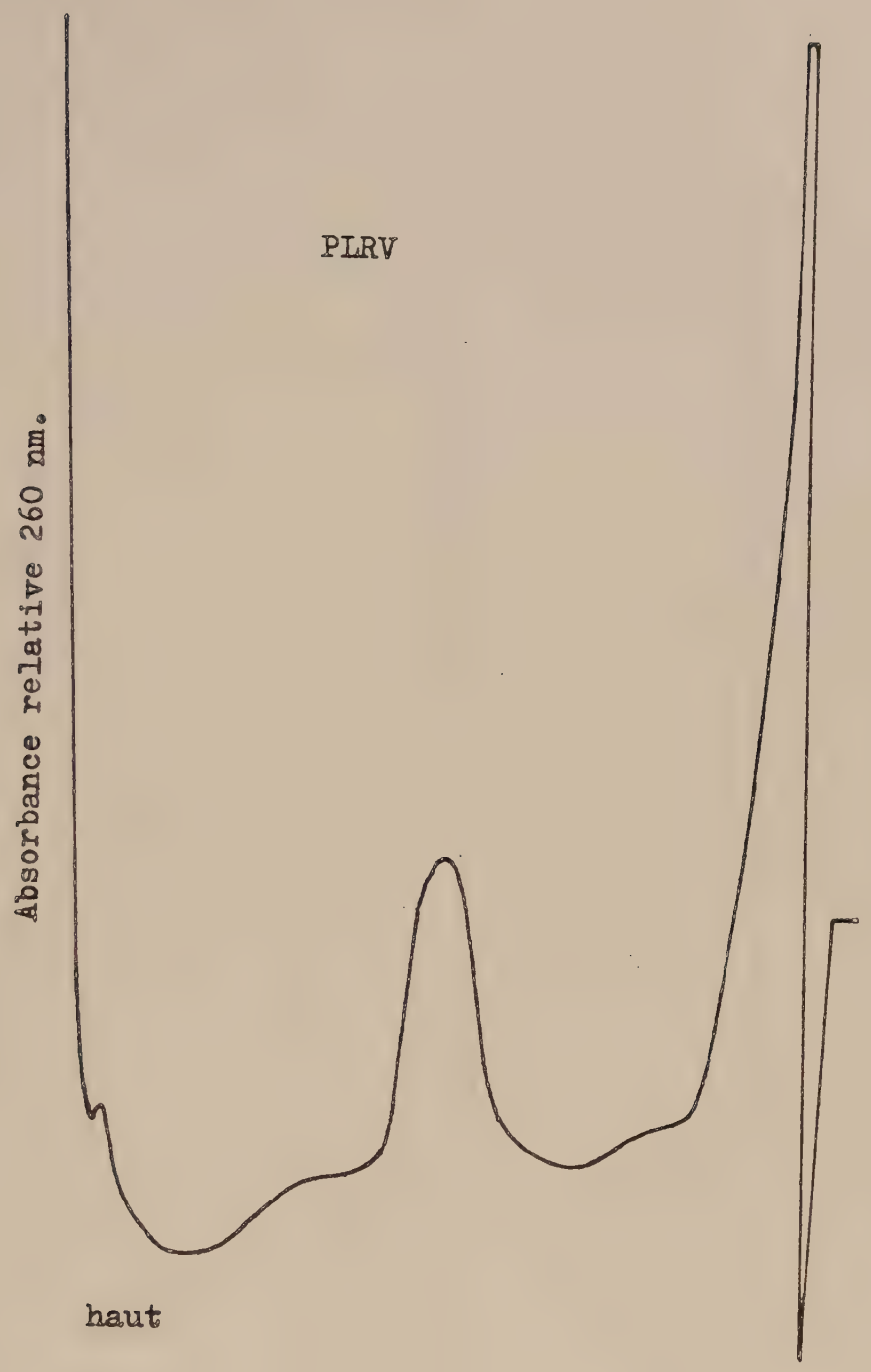
a . Les premiers extraits ne contiennent que peu de virus et seront éliminés. (GRAPHIQUE 9)

b . Le broyage doit être efficace - On effectuera un double broyage.

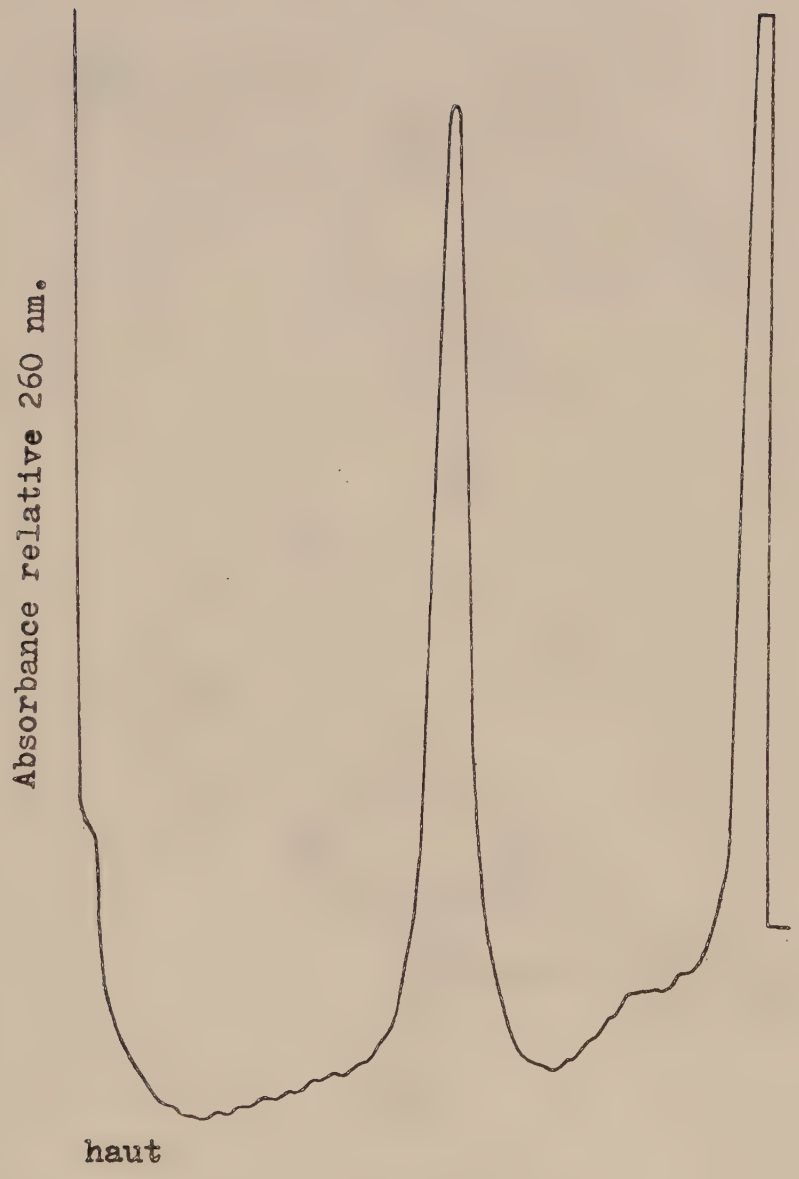
Le TABLEAU 13 sera le protocole définitif retenu. Il sera utilisé pour toutes les purifications ultérieures réalisées en vue de purifier l'acide nucléique viral ou pour réaliser des antisérum. (GRAPHIQUE 10).

Les illustrations A, B, C, visualisent la méthodologie employée.

* MEHRAD et LAPIERRE H. (1977) Ann. Phytopathol. 9 (1) 83-99



GRAPHIQUE 9 — 1e extraction feuilles-tiges sans broyage avec azote liquide - 4 kg - après 2 fois saccharose gradient - SW 41 - 55' - 40ᵏ - DO = 0,5 Ø 1 cm.



GRAPHIQUE 10

PURIFICATION du VERT

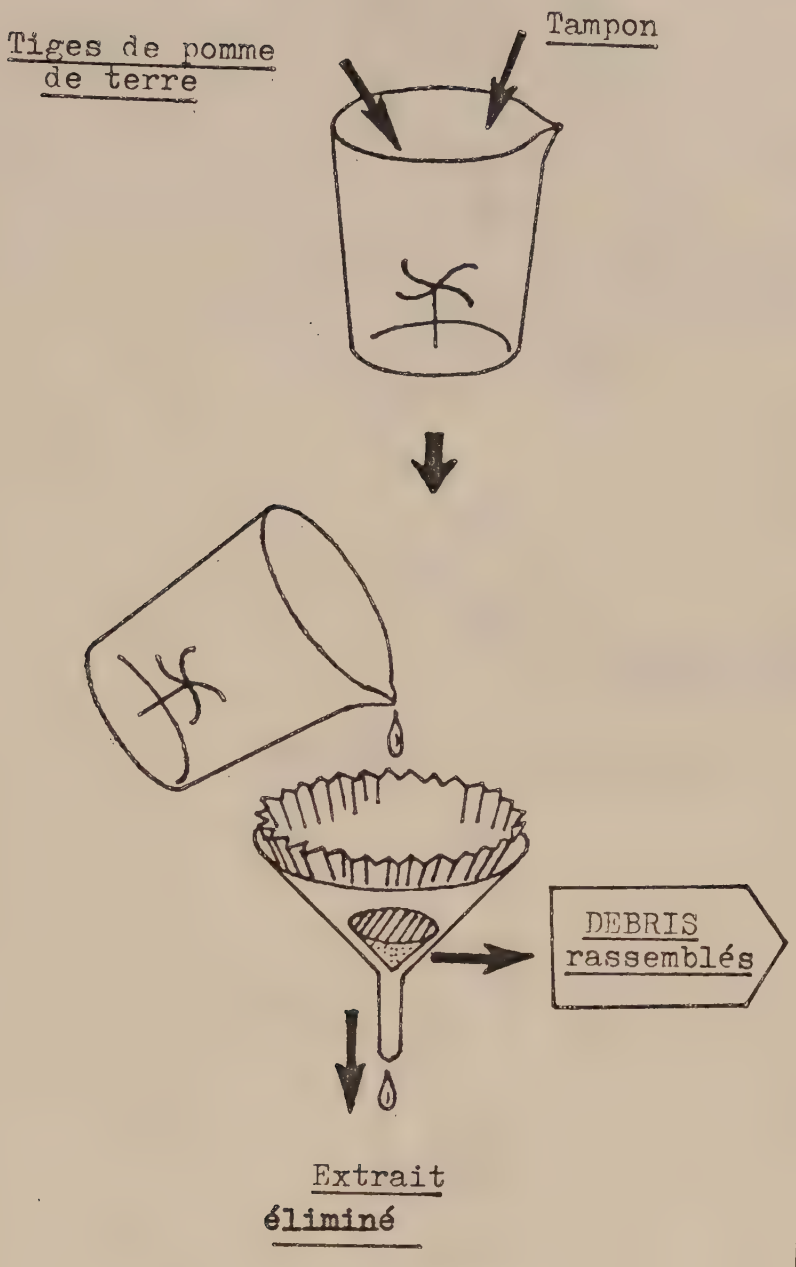


ILLUSTRATION A

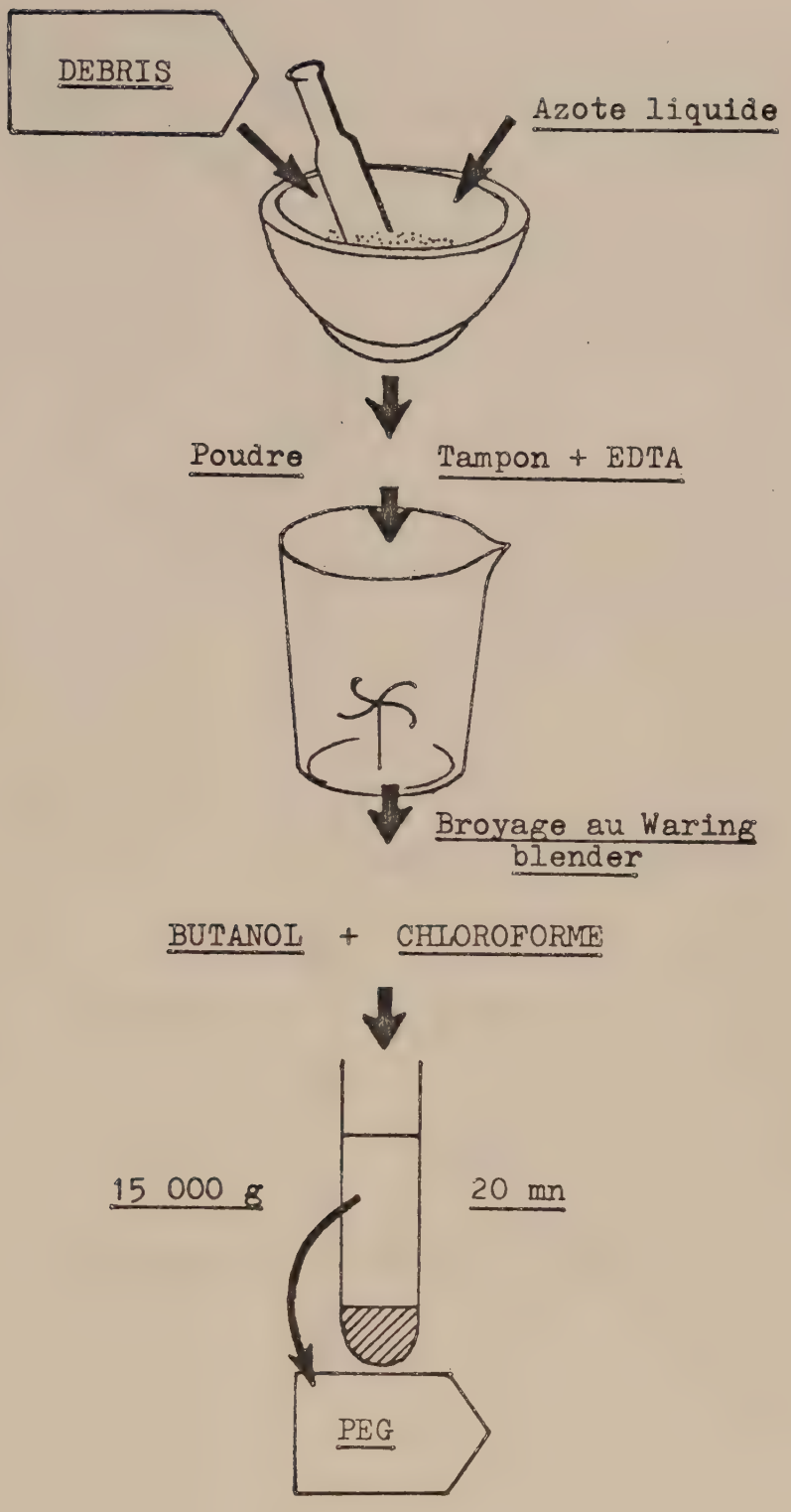


ILLUSTRATION B

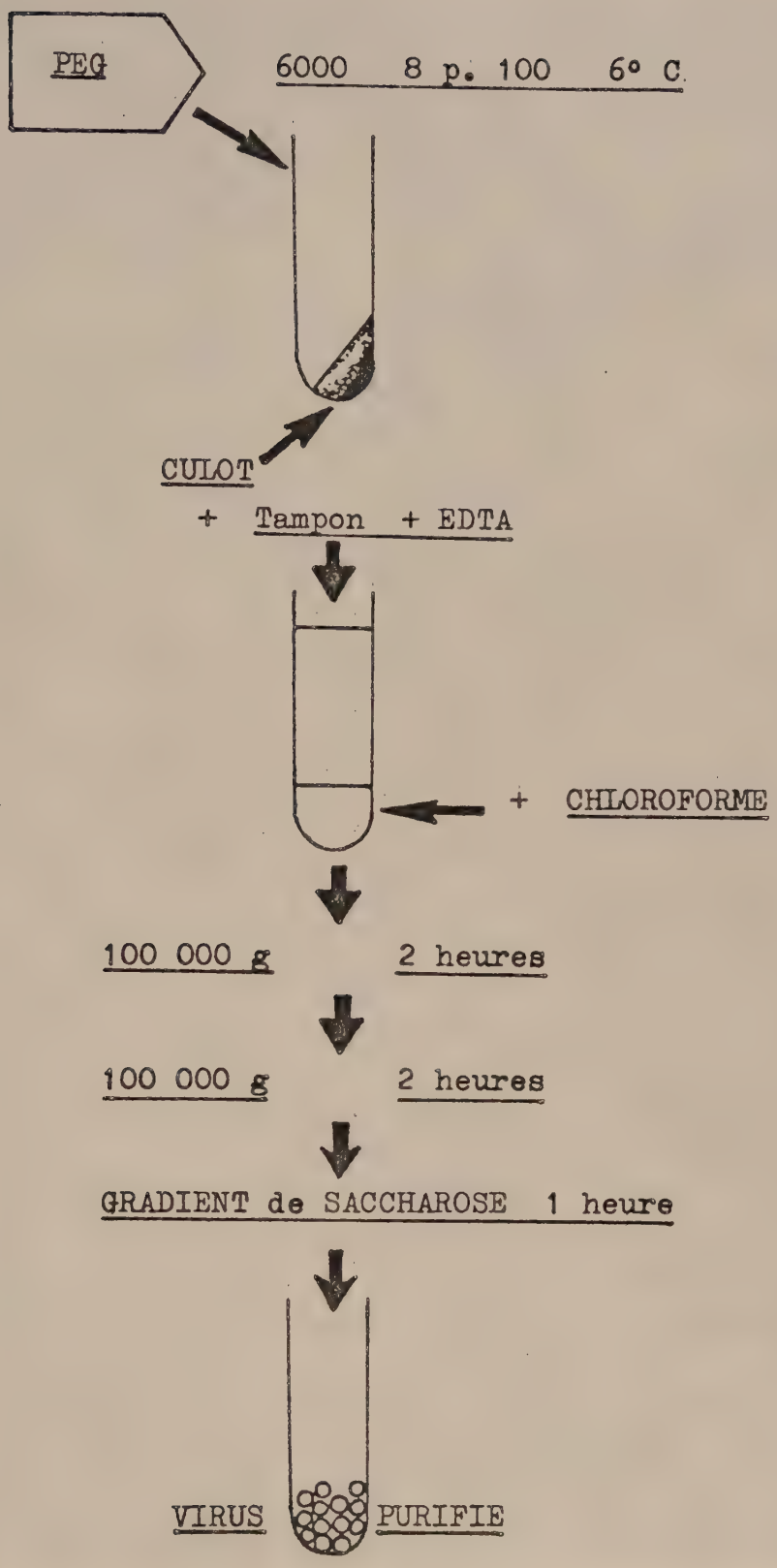
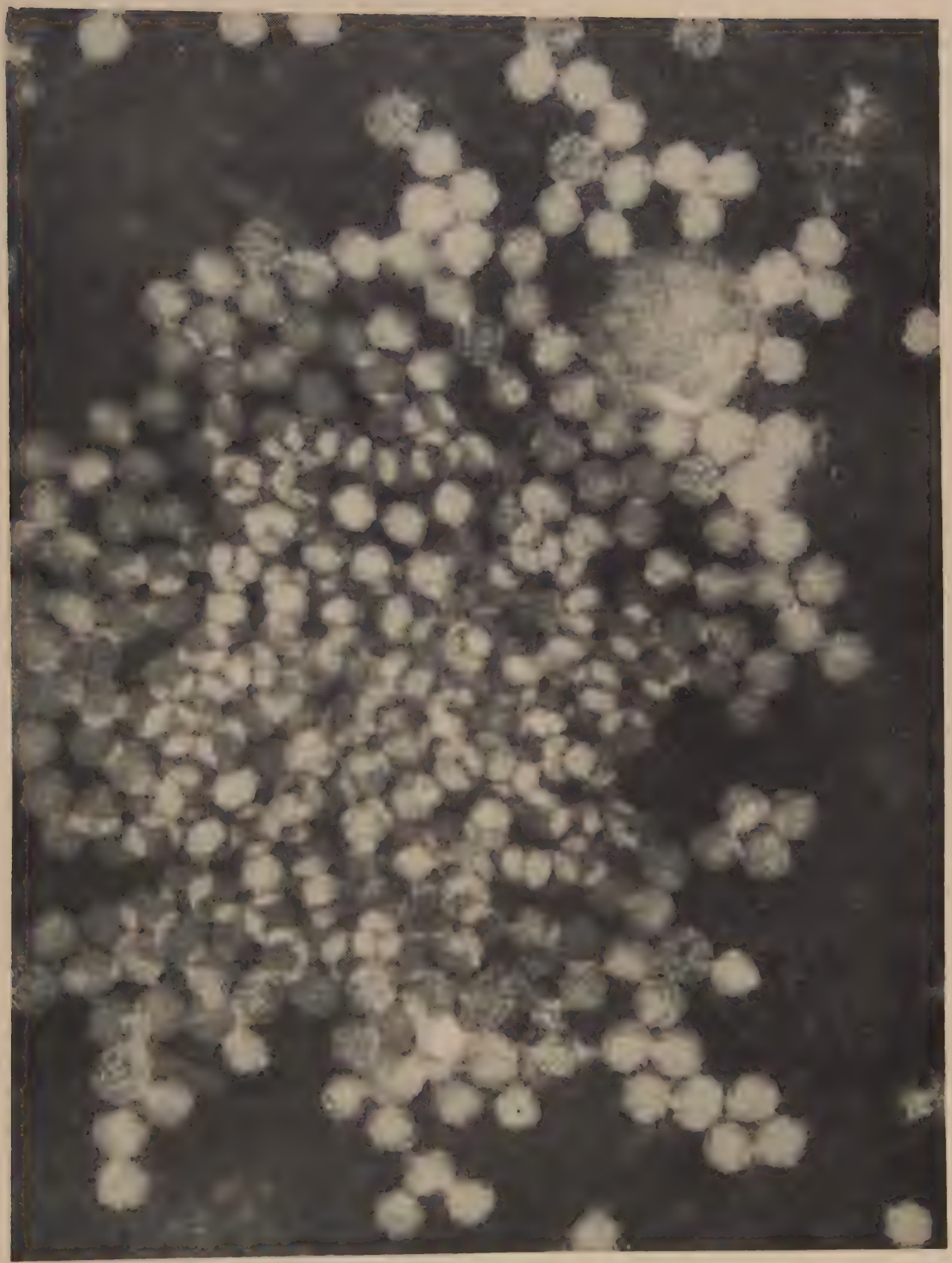


ILLUSTRATION C



|← 100 n m →|

VEPT **Observation au microscope électronique des fractions séparées en gradient de saccharose.**

Grossissement 360 000

L'enroulement de la pomme de terre

1	Broyage léger au waring blender des tiges de Pomme de terre dans le tampon PEM
2	Collecte du résidu sur étamines, élimination de la phase aqueuse
3	Broyage du résidu à l'azote liquide
4	Homogénéisation de la fraction obtenue au waring blender en présence de 2 volumes du tampon PEM
5	Collecte du résidu sur étamine
6	Nouveau broyage du résidu à l'azote liquide
7	Homogénéisation de la fraction obtenue au waring blender en présence de 2 volumes du tampon PEM
8	Agitation 15-30 minutes de l'extrait en présence de 1/2 volume du mélange chloroforme butanol (1/4+1/4 V/V) à 4° C
9	Séparation de la phase aqueuse et précipitation du virus par le PEG 6000, 8 p. 100
10	Collecte du précipité par centrifugation et reprise du virus dans un tampon PEM 0,01 M suivi d'une clarification avec Fréon ou chloroforme
11	Séparation de la phase aqueuse et ultracentrifugation
12	Séparation de la fraction virale en gradients de saccharose

TABLEAU 13

CHAPITRE III

PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES du VEPT

A. ASPECT EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DU VEPT.

Les particules ont été colorées négativement à l'acide phosphotungstique essentiellement à pH 7.
Elles présentent un diamètre moyen de 25 nm (mesure sur 200 particules) et sont homogènes en taille. Leur aspect est très variable et on peut les ranger en 6 groupes distincts.

1. Des particules très contrastées non pénétrées par l'acide phosphotungstique.

2. Des particules n'ayant conservé une forte densité que dans leur partie centrale.

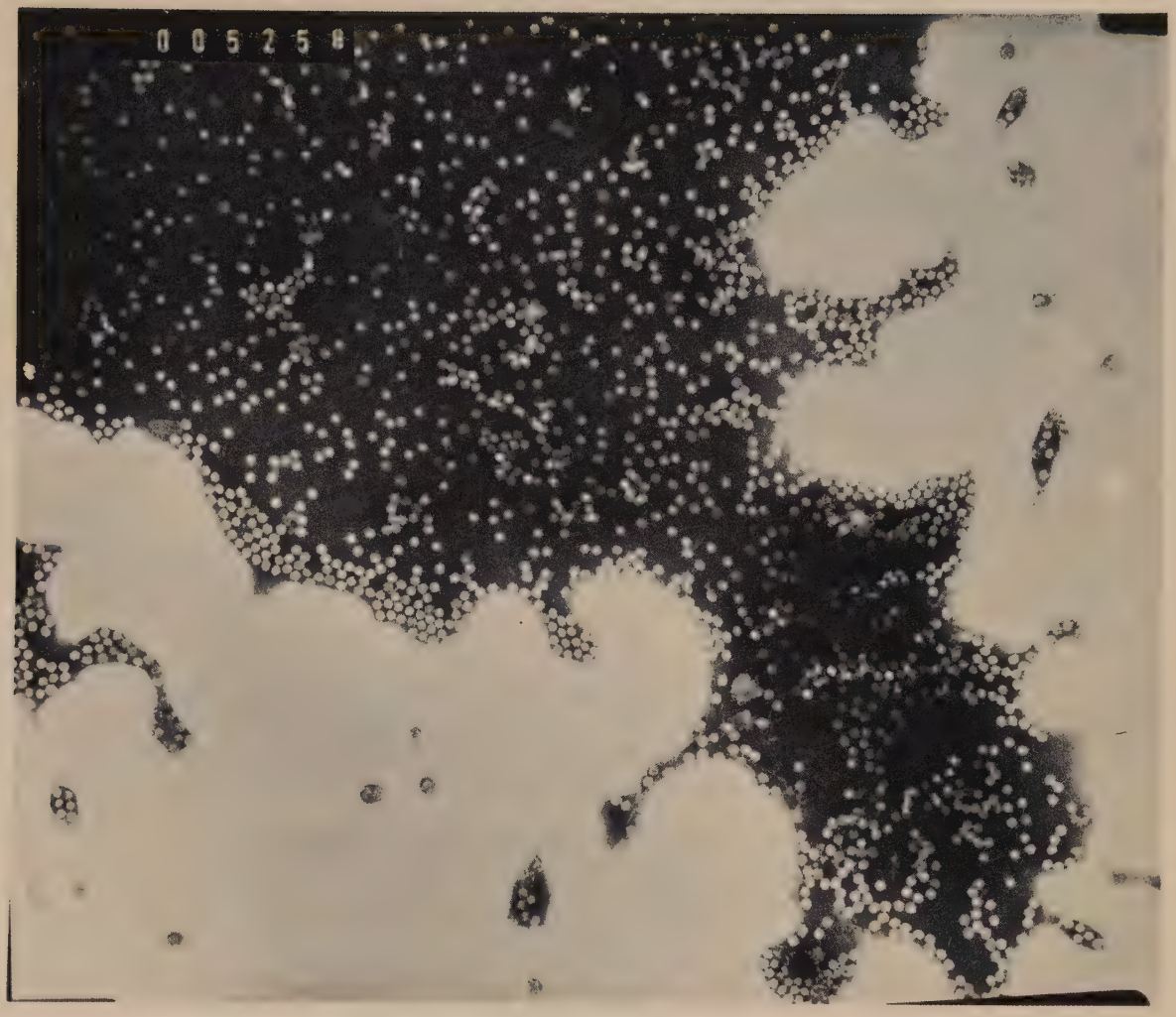
3. Des particules très pénétrées par l'acide phosphotungstique et qui ont aspect homogène gris.

4. Des particules grises, mais présentant une bordure légèrement plus dense.

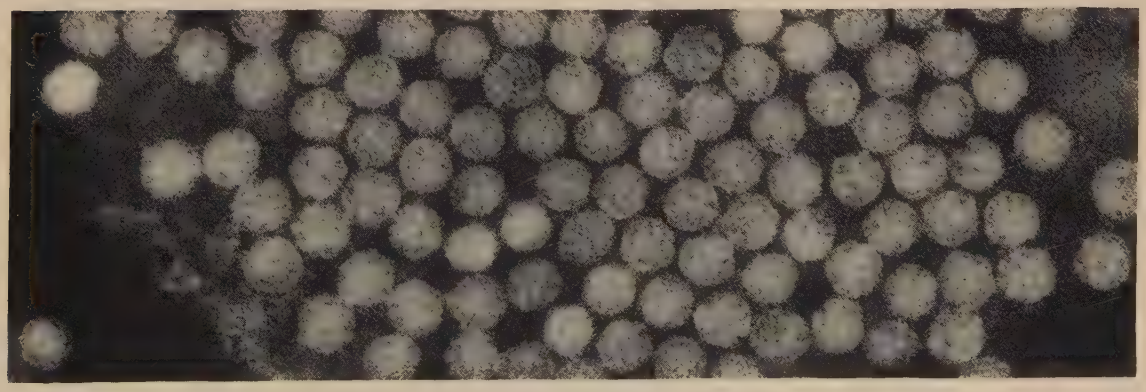
5. De très rares particules complètement pénétrées par l'acide phosphotungstique.

6. Des particules en cours de désagrégation et n'ayant pas perdu leur densité.

Les mesures effectuées sur toutes ces particules présentent les mêmes fluctuations de taille pour les groupes 1, 2, 3, 4, 5.



Electron micrographie des particules du VEPT, colorées négativement avec 2 p. 100 d'acide phosphotungstique (pH 7)



Grossissement 360 000

L'enroulement de la pomme de terre

Signification de la variabilité de l'aspect des particules en microscopie électronique.

On sait que l'acide phosphotungstique peut modifier considérablement la structure des particules, en particulier certains virus à RNA à symétrie cubique et à liaison RNA protéines sont complètement dégradés à pH 7 en présence de ce colorant.

D'autres virus peuvent subir une perte complète de leur acide nucléique. (cas du virus de la Mosaïque Modérée du Dactyle souche 2).

Dans le cas du VEPT on observe une dégradation partielle du virus sans qu'il se forme (ou exeptionnellement) des particules de type 5. Ces résultats permettent de penser que le VEPT à un comportement analogue aux virus à liaison RNA protéines de type Bromo ou Cucumo virus. Cependant ces derniers sont instables à pH 7.

B. SPECTRE D'ABSORPTION EN ULTRAVIOLET (UV) DES NUCLEOPROTEINES DU VEPT.

Le spectre d'absorption en UV du VEPT (GRAPHIQUES 11, 12, 13, 14) présente les caractères typiques des nucléoproteines :

- maximum d'absorption à 2600 A°
- minimum d'absorption entre 2400 et 2350 A°

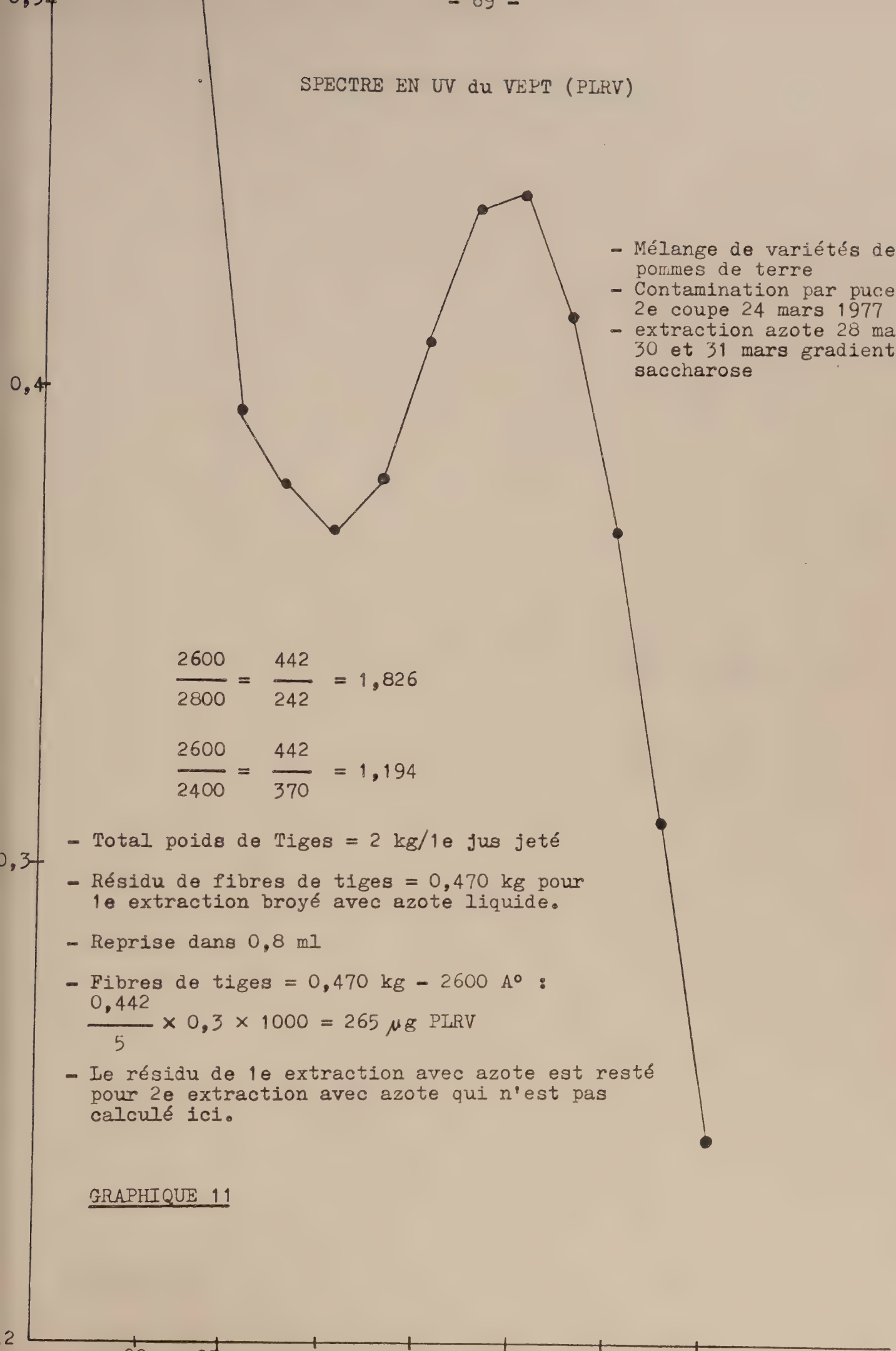
Paul (1959) a établi une relation entre le rapport $\frac{\text{absorption à 2800 A°}}{\text{absorption à 2600 A°}}$ et le pourcentage d'acide nucléique chez le virus sans enveloppe.

Cette relation est approximative : elle permet cependant de conclure dans le cas du VEPT à une concentration élevée d'acide nucléique dans les particules (supérieure à 40 p. 100).

Le spectre d'absorption en UV du VEPT est très proche de celui qui a été observé chez le Soybean Dwarf Virus (TAMADA, 1975, KOJIMA et TAMADA, 1976) (KOJIMA et SHIKATA 1976) et le virus de la jaunisse nanisante de l'orge (ROCHOW et al 1971) (BRAKKE et ROCHOW 1974) aussi bien que les souches MAV que RPV (TABLEAU 14). Cette propriété, commune à ces virus permet de penser que pour l'ensemble des Luteovirus, on doit effectivement retrouver un pourcentage élevé en acide nucléique.

Cependant cette caractéristique n'est pas spécifique du groupe (voir chapitre V).

SPECTRE EN UV du VEPT (PLRV)



- Mélange de variétés de pommes de terre
- Contamination par pucerons 2e coupe 24 mars 1977
- extraction azote 28 mars 30 et 31 mars gradients de saccharose

$$\frac{2600}{2800} = \frac{442}{242} = 1,826$$

$$\frac{2600}{2400} = \frac{442}{370} = 1,194$$

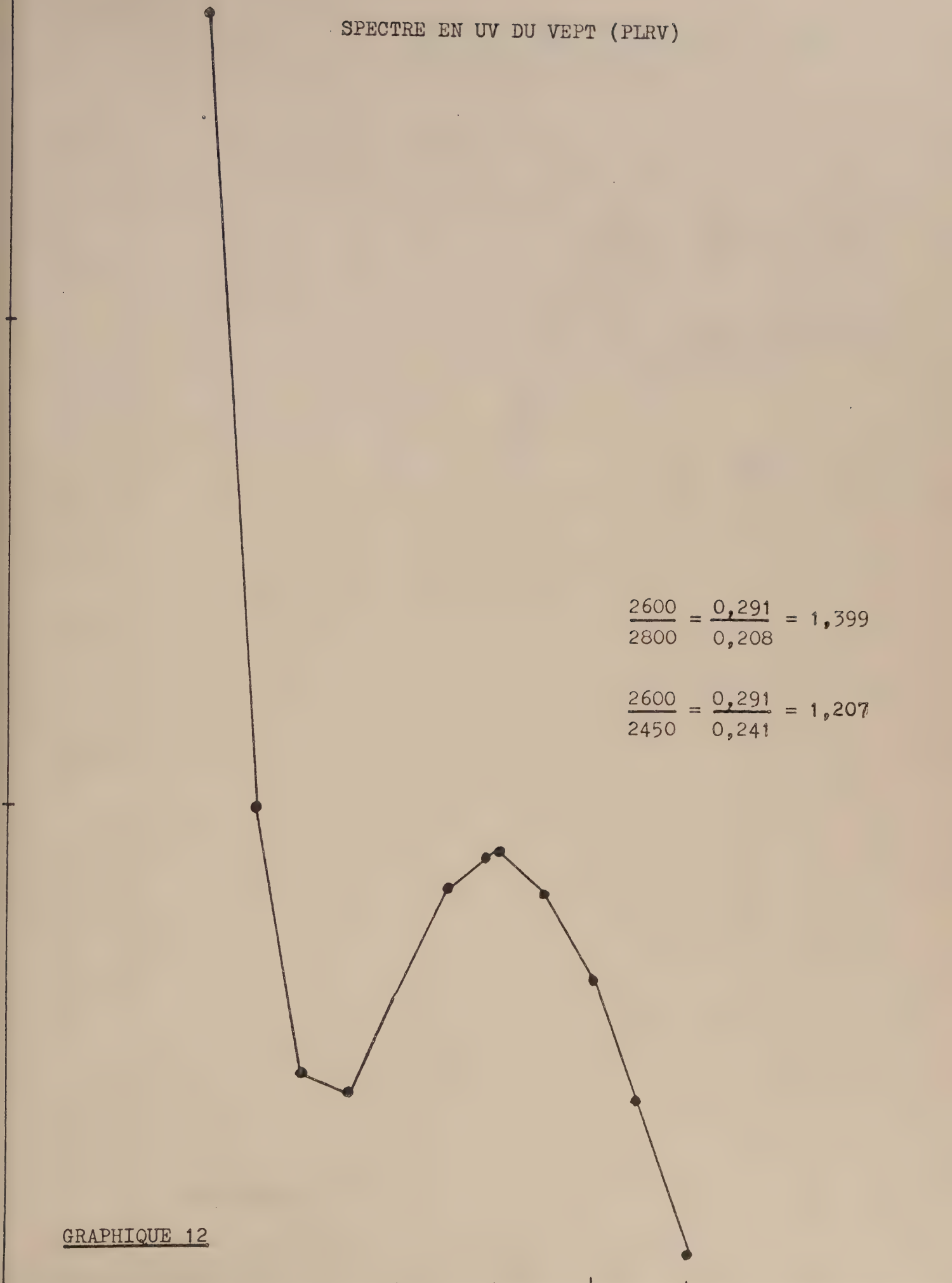
- Total poids de Tiges = 2 kg/1e jus jeté
- Résidu de fibres de tiges = 0,470 kg pour 1e extraction broyé avec azote liquide.
- Reprise dans 0,8 ml
- Fibres de tiges = 0,470 kg - 2600 A° :

$$\frac{0,442}{5} \times 0,3 \times 1000 = 265\ \mu g \text{ PLRV}$$

- Le résidu de 1e extraction avec azote est resté pour 2e extraction avec azote qui n'est pas calculé ici.

GRAPHIQUE 11

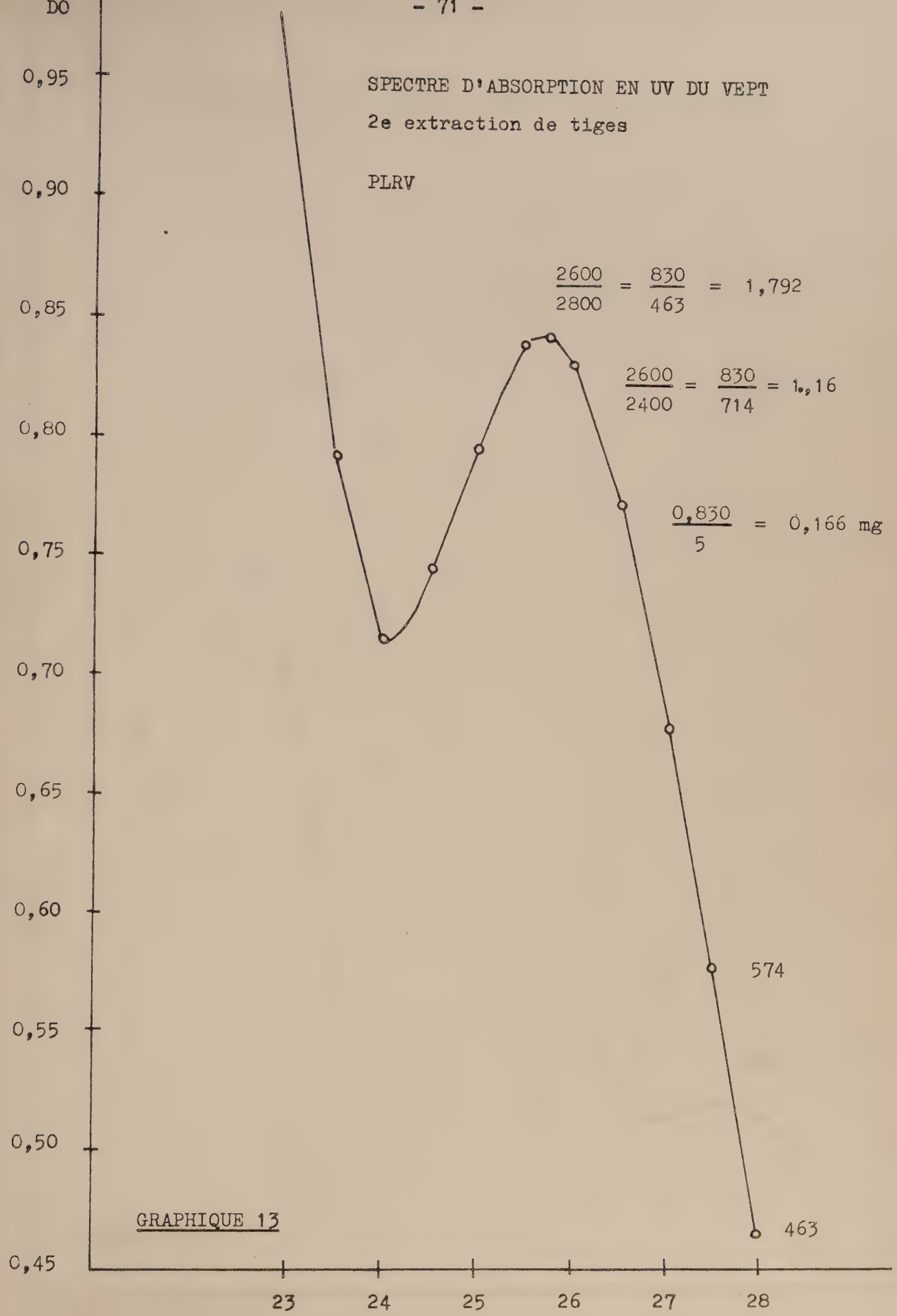
SPECTRE EN UV DU VEPT (PLRV)



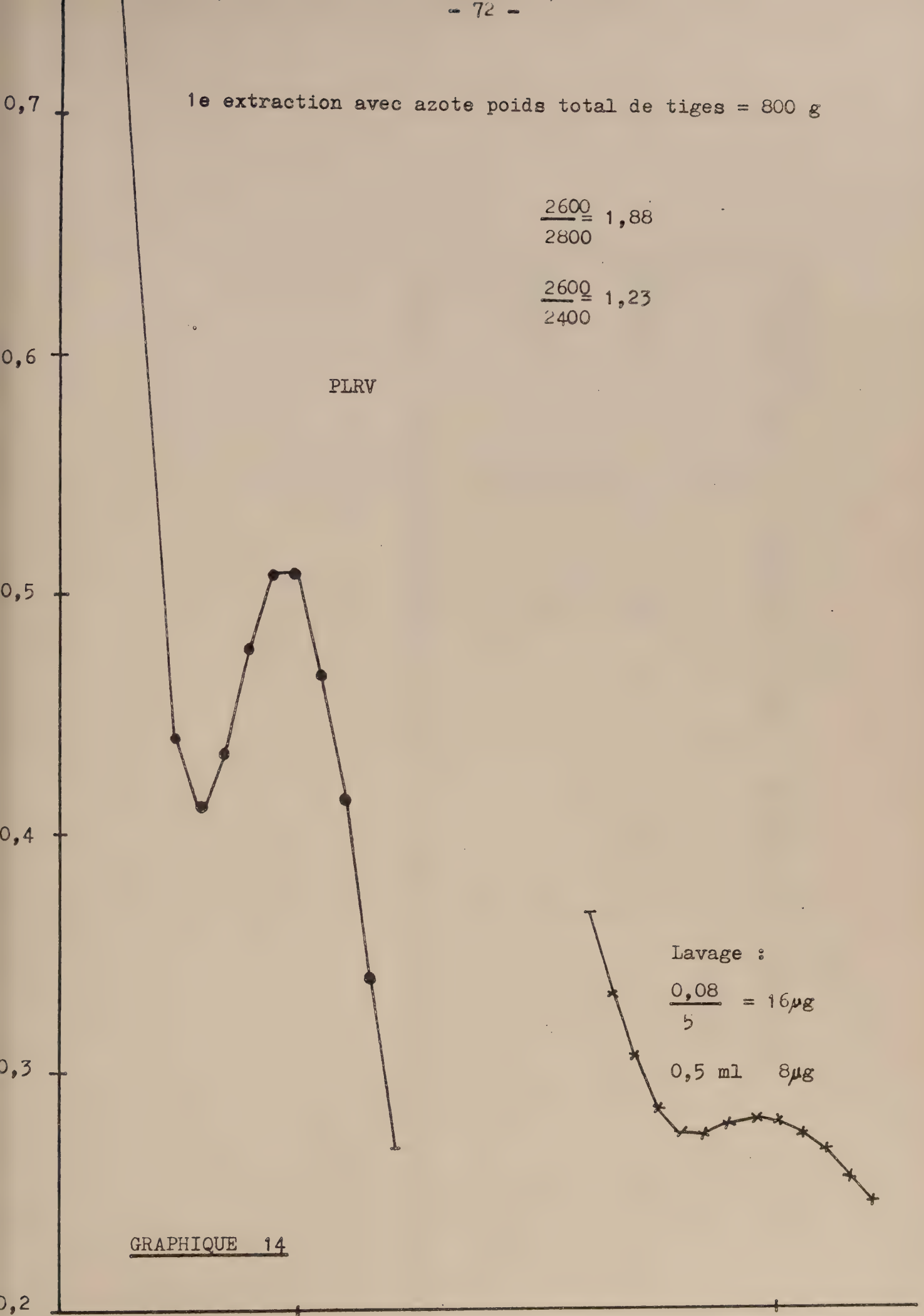
$$\frac{2600}{2800} = \frac{0,291}{0,208} = 1,399$$

$$\frac{2600}{2450} = \frac{0,291}{0,241} = 1,207$$

GRAPHIQUE 12



GRAPHIQUE 13



GRAPHIQUE 14

RAPPORT DE DENSITE OPTIQUE	VEPT		VJNO	
	MEHRAD ET AL 1978	SARKAR 19	ROCHOW 1974	
			souche MAV	souche RPV
2800 A° / 2600 A°	0,52	0,58	0,52	0,54
2300 A° / 2600 A°	1,09		0,82	0,91

TABLEAU 14 Rapport d'absorption en U.V. à trois longueurs d'ondes de différents Luteovirus

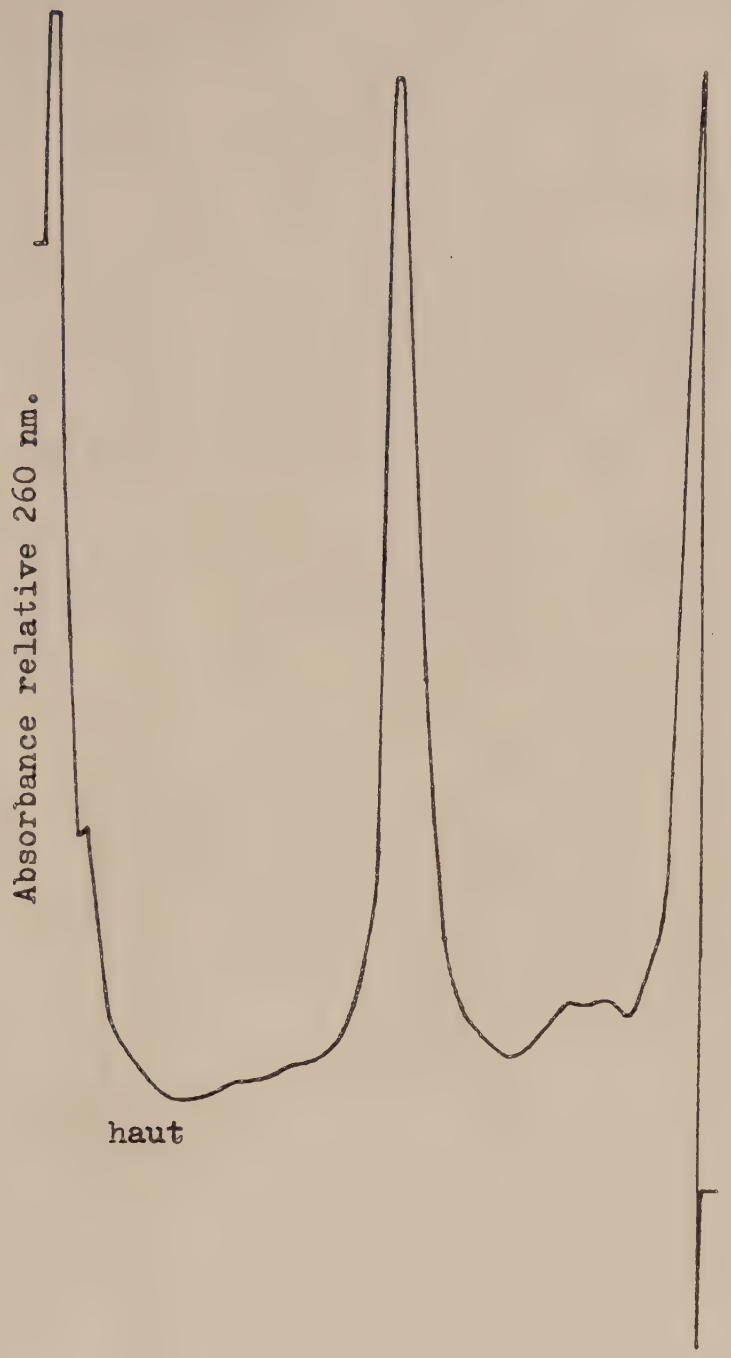
C. COMPORTEMENT DES PARTICULES VIRALES DANS UN GRADIENT DE SACCHAROSE.

Dans un gradient de saccharose linéaire (5-20 p. 100) les particules purifiées du VEPT se présentent sous forme monodispersée (GRAPHIQUE 15/a).

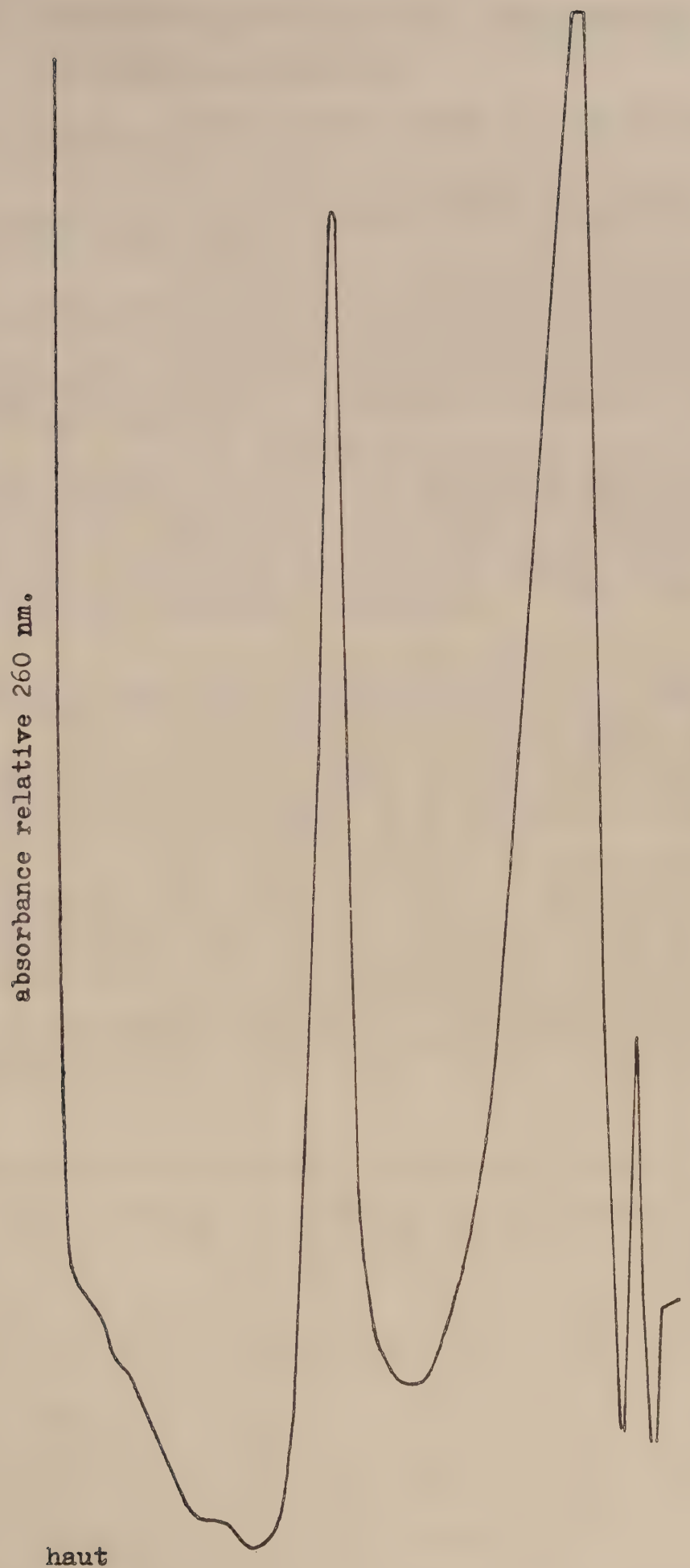
La constante de sédimentation a été estimée que par rapport à celles du virus de la jaunisse nanisante de l'Orge et le phage à RNA R 17.

On a pu estimer cette constante à 110 S.

Une seule expérience de ce type a été effectuée. Sur les graphiques d'enregistrements des gradients de saccharose on peut quelque fois observer la présence d'une fraction présentant une constante de sédimentation plus élevée. Celle-ci pourrait correspondre à des dimères du virus. (GRAPHIQUE 15/b).



GRAPHIQUE 15 a



GRAPHIQUE 15 b

D. COMPORTEMENT DES PARTICULES DANS DIFFERENTS GRADIENTS A L'EQUILIBRE.

Trois sels de sodium ont été utilisés en vue de caractériser le virus.

On sait que le chlorure de césium a tendance à dégrader les virus à liaisons stricts RNA protéines. (LOT et KAPER 1973).

Au contraire le sulfate de césium présente des propriétés antichaotropiques et évite la dégradation de ces virus dans les milieux très concentrés en sels.

Cependant le sulfate de césium peut déclencher l'apparition d'états structuraux différents d'un virus (HULL 1976). Enfin, le formiate de césium est réputé être bon stabilisateur.

Pour le VEPT l'expérience montre que pour les trois sels on obtient un seul composant lors d'une ultracentrifugation dans les conditions décrites au TABLEAU 15. Cependant ce n'est qu'avec le formiate et le sulfate de césium que l'on a pu obtenir d'une manière reproductible la formation de bandes lors des ultracentrifugations à l'équilibre.

Avec le chlorure de césium on a pu observer que la présence de formaldehyde à 0,5 p. 100 permettait une meilleure stabilisation du virus (TABLEAU 15).

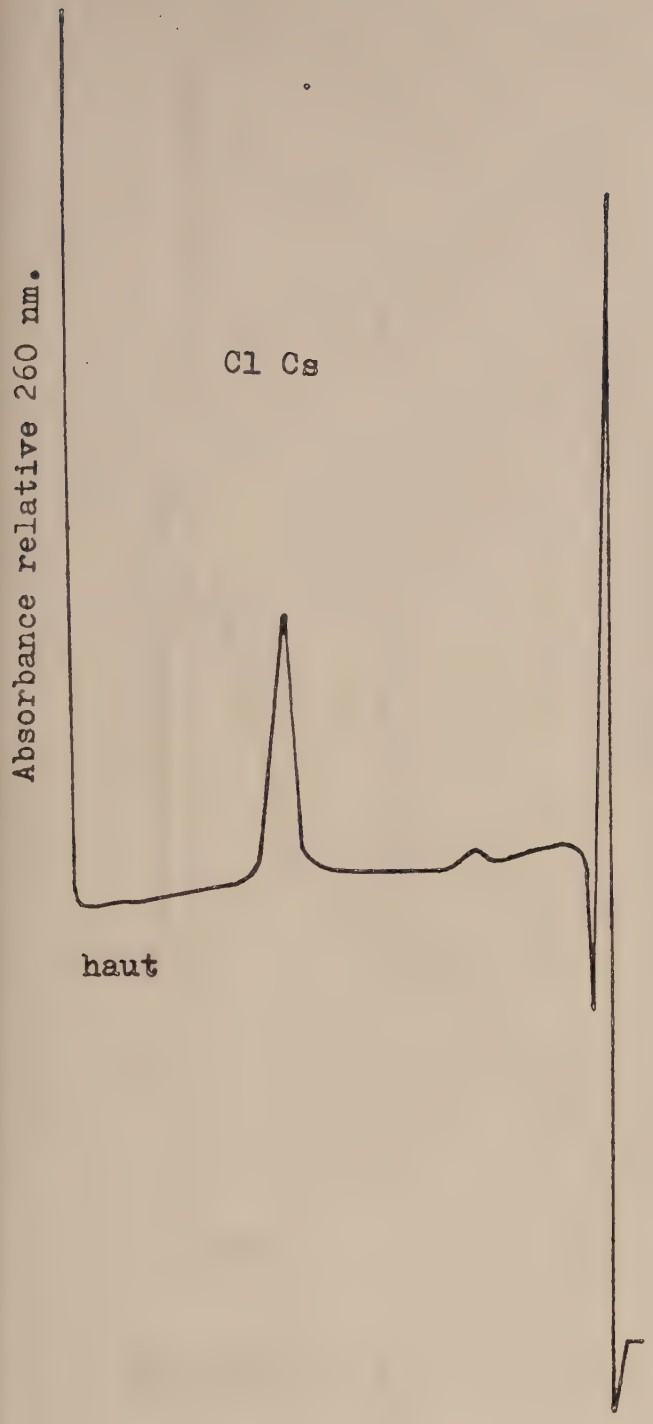
En présence de sulfate de césium on a pu observer la présence de, non pas une, mais plusieurs bandes lors de centrifugation à l'équilibre (GRAPHIQUE 16 a), alors qu'avec le chlorure ou le formiate une seule bande est observée (GRAPHIQUE 16 b).

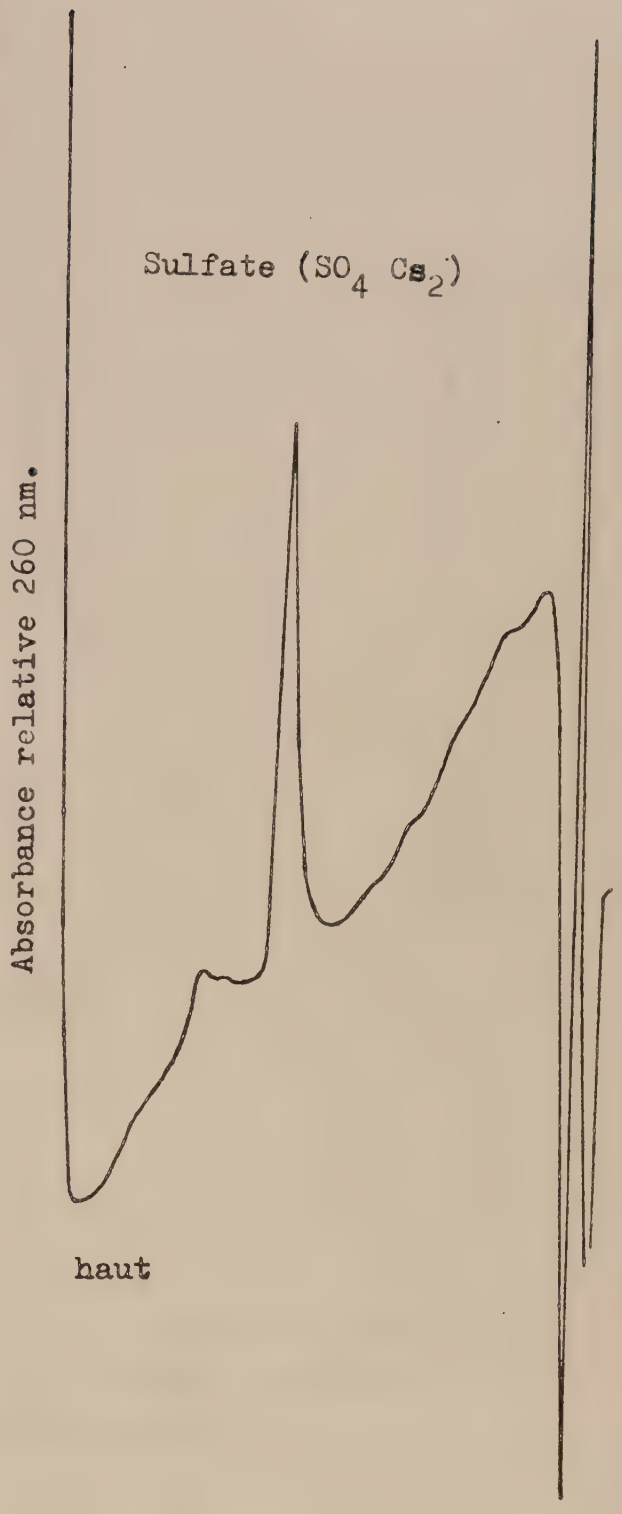
En sulfate de césium le comportement du VEPT rappelle donc celui des virus du type Southern Bean Mosaic, cependant nous n'avons pu reproduire les conditions qui permettaient la multiplication des bandes lors de l'ultracentrifugation à l'équilibre.

Il serait d'ailleurs intéressant d'étudier la reversibilité éventuelle du phénomène en effectuant un nouveau cycle d'ultracentrifugation en sulfate de césium.

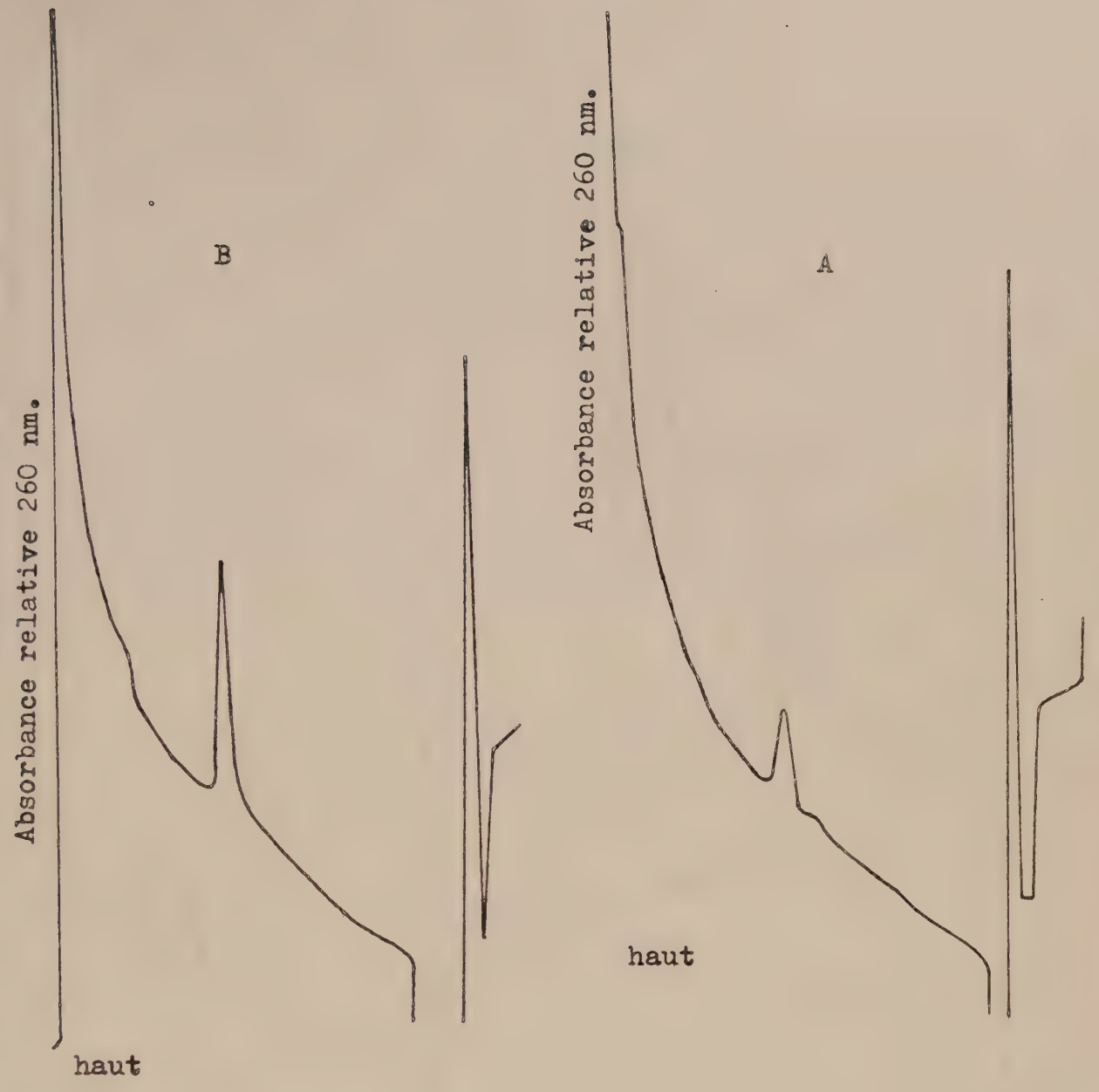
Sel de césium	Poids de sel par gramme de tampon	Présentation du virus dans le sel à l'équilibre.
SO_4	0,6	monodispersé
Cl	0,6	"
$CH\ O_2$	0,5	"

TABLEAU 15 Effet de sels de césium sur la stabilité du VEPT ultracentrifugation à l'équilibre



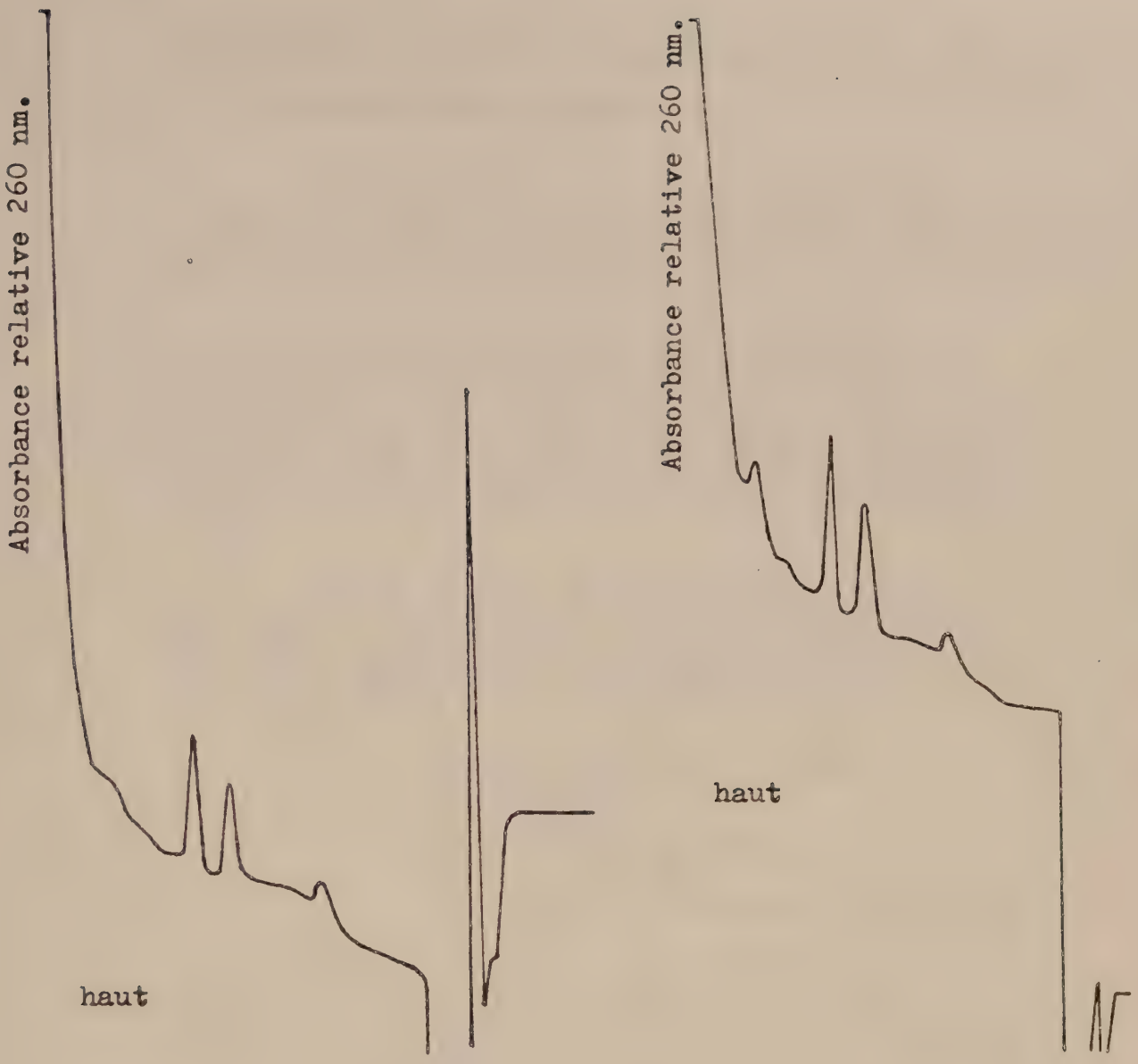


GRAPHIQUE 16 a



GRAPHIQUE 16 b

Ultracentrifugation du VEPT à l'équilibre dans du chlorure de cesium (0,5 g de sel par gramme de tampon) avec (A) ou sans formaldehyde (B)



GRAPHIQUE 16 c

Ultracentrifugation du VEPT à l'équilibre dans du sulfate de cesium (0,47 g/g de tampon).

E. L'ACIDE NUCLEIQUE DU VIRUS.

Extraction de l'acide nucléique du Virus de l'Enroulement de la Pomme de Terre (PLRV).

Plusieurs fois 0,5-1 ml de suspension virale ont été utilisés pour l'extraction de l'acide nucléique du PLRV dans le laboratoire de biologie de l'Institut Curie à Paris.

Le virus purifié de PLRV est extrait plusieurs fois pour obtenir son acide nucléique par, le plus souvent, la combinaison de deux techniques : celle utilisant la préparation phénolée d'ARN et celle utilisant le SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) et la proteinase K. de la manière suivante, cette expérience ayant été réalisée à l'institut Curie :

0,5 ml ou 1 ml de suspension de virus purifié, pH = 7,1 dans un tampon 0,05 ou 0,01 M sans EDTA, sans Mercaptoéthanol, contenant à chaque fois à peu près 50 μg à 100 μg de PLRV, sont mélangés à 30° C pendant 30 minutes, avec :

0,02 M dithioerythrithol
0,15 M NaCl
0,015 M EDTA
0,05 M Tris-HCl (pH=8)
0,25 p. 100 SDS
0,5 mg/ml protéinase K (BOEHRINGER)

Ensuite le mélange est maintenu à 55° C pendant 5 à 6 minutes et le mélange réaction est traité deux fois avec un volume égal de phénol saturé et centrifugé dans une centrifugeuse SORVAL pendant 5-6 minutes à 12 000 g.

Les deux phases phénolées, obtenues au cours des 2 expériences sont lavées successivement avec de l'eau distillée stérile et les phases aqueuse surnageantes (qui contiennent l'acide nucléique du PLRV) sont recueillies.

A ces phases aqueuses mélangées ensemble sont ajoutés un dizième de volume d'acétate de potassium M = 2, pH = 5 et 2 volumes d'éthanol (3 ml d'alcool éthylique = éthanol à 100 p. 100) conservé à - 20° C.

Le mélange est secoué et gardé à 4° C au réfrigérateur pendant toute une nuit.

L'acide nucléique ainsi précipité est recueilli par ultra-centrifugation dans le ROTOR SW 60 ou SW 50 pendant 30 minutes à 250 000 g = 40 000 RPM.

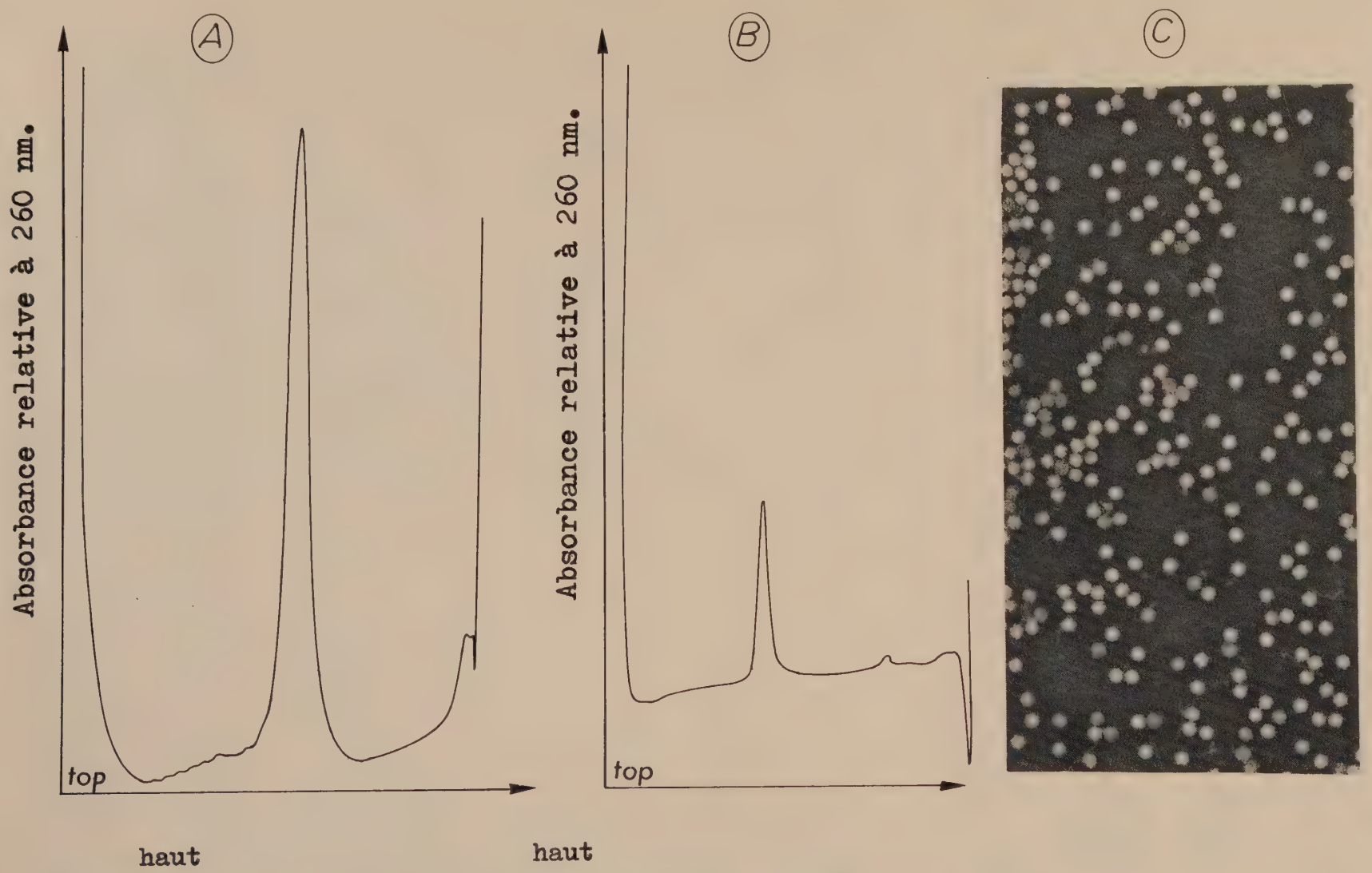


Fig. 1. Purification du VEPT (A) centrifugation dans 5-20 % gradient de saccharose dans 0,01 M Na phosphate (pH=7,2) et 1mM EDTA (4°C, 273 000 × g, 60 min.) (B) centrifugation à l'équilibre dans CsCl dans 0,01 M Na - phosphate (pH = 7,2) 1 m M EDTA et 0,025 M 2 - mercaptoethanol (début de densité = 1,38g/cm^3 ; rotor SW 50, 4°C, 175 000 × g, 50 h). (C) Electron micrographe des particules colorées négativement avec 2 % d'acide phosphotungstique (pH = 7) (x 72 000).

Le surnageant est jeté et le culot qui contient l'acide nucléique du PLRV est séché sous vide pendant 15 minutes puis dissous à l'eau distillée, autoclavée pour éliminer toute contamination par les enzymes.

La concentration en acide nucléique est vérifiée par spectrophotométrie, l'extinction est mesurée à 260 nm, elle dépend de la quantité de virus et on trouve 5-10 μg d'acide nucléique (pour 50-100 μg de virus).

L'hydrolyse des acides nucléiques est réalisée d'une part avec la DNase pancréatique de bovin (WORTHINGTON DPFF) et d'autre part avec la RNase pancréatique de bovin (WORTHINGTON RAF) préalablement chauffées à 100° C pendant 5 minutes pour détruire toute activité de contamination de la DNase.

L'Hydrolyse est réalisée à 37° C pendant 45 minutes.

Le mélange d'incubation pour la RNase est :

- 0,3 — 1 μg ARN, 0,01 M Tris-HCL (pH 7,4), 0,001 M EDTA, et 0,001 μg RNase chauffée.

et pour la DNase :

0,3-1 μg ADN, 0,01 M Tris-HCL (pH = 7,4), 0,01 M Mg Cl_2
0,001 M EDTA, 0,025 M 2-Mercaptoéthanol,
5 p. 100 glycérol et 0,001 μg DNase chauffée.

Les acides nucléiques, initial et hydrolysé, sont analysés par électrophorèse sur plaques de gel verticales (0,16 cm d'épaisseur et 15 cm de long) à pH = 7,8.

Le gel est composé de 1 p. 100 ou 1,5 p. 100 d'agar et 2 μg/ml d'éthidium bromidium ou de 2, 5 p. 100 d'acrylamide, 0,5 p. 100 d'agar et 2 μg/ml bromide d'éthidium.

Après migration, les bandes d'ARN ou d'ADN sont localisées par fluorescence avec le bromide d'éthidium et photographiées.

Le tampon d'électrophorèse utilisé dans cette expérience est :

Tris 0,1 M/l
acétate de sodium, 3 H_2O : 0,2 M
EDTA disodique M = 0,02
acide acétique 19 ml

On complète à l'eau distillée pour former 1 litre de tampon, son pH est égal à 7,8.

Fig. 2. Analyse de l'acide nucléique du VEPT par électrophorèse dans 1 % de gel d'agarose.
(1) acide nucléique d'origine,VEPT
(2) acide nucléique traité DMSO.

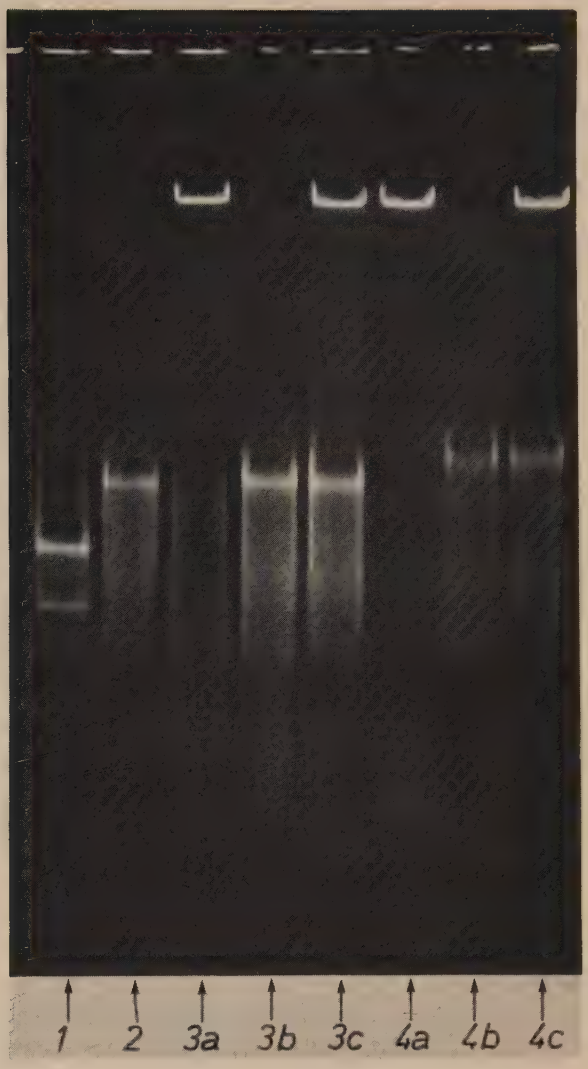


Fig 3. RNase ou DNase traitements de l'acide nucléique du VEPT, controlé par électrophorèse dans 1 % de gel d'agarose.
(1) E. Coli r RNA
(2) BYDV RNA
(3) mélange de l'acide nucléique du VEPT et λDNA :
(a) RNase-traitée
(b) DNase-traitée
(c) sans nuclease
(4) mélange de TMV RNA et λ DNA :
(a) RNase traitée
(b) DNase traitée
(c) sans nuclease.

Le mélange bleu (mix blue) ajouté à l'acide nucléique avant électrophorèse est composé comme suit, son volume total étant de 50 ml :

SDS à 1 p. 100 : 5 ml soit 10 p. 100 de la solution

EDTA 0,026 M : 20 ml

Glycérol : 25 ml

Bleu de Bromophénol 25 mg, ce qui correspond à 0,5 mg/ml.

Comme Témoins on a utilisé :

Les ARN linéaires à hélice simple du virus Mengo (PM : $2{,}8.10^6$ daltons), de la souche commune du virus de la Mosaïque du Tabac (TMV. ARN, PM $2{,}1.10^6$ daltons), du virus de la jaunisse nanisante de l'orge transmise par Rhopalosiphum Padi (BYDV. ARN : PM = $1{,}8.10^6$ daltons) des ribosomes cytoplasmiques du solanum tuberosum (25s et 18s, respectivement $1{,}3.10^6$ et $0{,}7.10^6$ daltons) des ribosomes d'Escherichia Coli (23s et 16s, respectivement de PM = $1{,}2.10^6$ daltons, $0{,}55.10^6$ daltons) et l'ADN linéaire à double hélice du bactériophage lambda (λ Q 377, λ ADN : 30.10^6 daltons).

Résultats :

L'analyse de l'acide nucléique initial extrait du PLRV révèle une bande très tranchante au milieu du gel (figure 2 bande 1) si l'acide nucléique du PLRV est traité avec 95 p. 100 de dimethylsulfoxide (DMSO) avant électrophorèse, on trouve à nouveau une seule bande mais dans une position légèrement décalée (en retard) dûe à un certain rétrécissement du gel (figure 2 bande 2).

Après un traitement semblable au DMSO et migration électrophorétique l'ARN génominal du TMV n'est pas affecté, tandis que l'ADN linéaire double hélice du virus de la Mosaïque du Choux est dénaturé.

De tel résultats indiquent que les molécules d'acide nucléique du PLRV ne possèdent pas de cassure dissimulée et qu'elles sont encore

Fig. 4 Extraction de RNA PLRV
en présence de Exogène DNA et
analyse par électrophorèse dans
p. 100 de gel d'agarose.
(1) VEPT RNA à partir des tiges :
(a) avec λ DNA
(b) controle
(2) VEPT RNA à partir des feuilles:
(a) avec λ DNA
(b) controle

Fig. 5 Préincubation du VEPT avec DNase ou RNase et analyse directe de l'acide nucléique après SDS - traitement proteinase K, par électrophorèse dans 1,5 % de gel d'agarose.
Préincubation :
(1) sans nuclease
(2) avec DNase
(3) avec RNase
(4) TMV RNA comme marque de migration

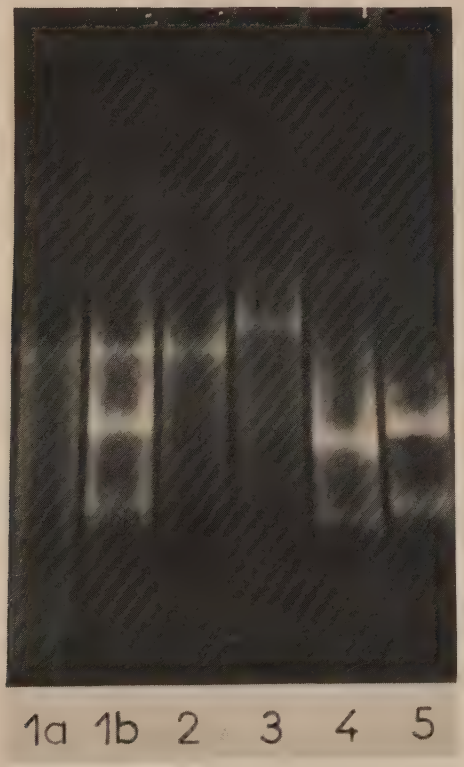


Fig. 6 - Préincubation du VEPT avec RNase avec la présence de plante hôte cytoplasmique r RNA et analyse comme expérimenté Fig. 5.
(1) mélange de VEPT et r RNA préincubé :
(a) avec RNase
(b) sans RNase
(2) PLRV préincubation sans RNase.
marques de migration :
(3) TMV RNA
(4) E. coli r RNA
(5) S. tuberosum r RNA

homogènes après extraction.

L'acide nucléique du PLRV est incubé en présence d'autres RNAse ou DNAse. Les données révèlent qu'il est hydrolysé par la RNAse et non par la DNAse. Par conséquent l'acide nucléique du PLRV semble être de l'ARN. Cependant, afin de renforcer cette conclusion des expériences ont été réalisées en traitant avec chaque enzyme un mélange d'acide nucléique du PLRV et d'ADN λ dans le même essai.

La figure 3 (bande 3a), a montré qu'après traitement à la RNAse, la bande correspondant à l'acide nucléique du PLRV disparait tandis que la bande de l'ADN λ n'est pas effacée et que la DNAse hydrolyse l'ADN λ mais pas l'acide nucléique du PLRV (figure 3 bande 3b).

Un mélange d'ARN de TMV et d'ADN λ a été utilisé pour controler ces expériences (figure 3 bande 4a et 4b).

Les résultats de ces expériences démontrent fortement et clairement que le PLRV contient de l'ARN.

En considérant la découverte (SARKAR 1973/76) ADN dans le PLRV, que le PLRV contiendrait de l'ADN, nous entreprenons d'autres expériences pour exclure la possibilité de perte de l'ADN au cours de l'extraction de l'acide nucléique viral ainsi que pour démentir que l'ARN observé correspond à l'acide nucléique autrefois engagé dans un complexe spécifique, avec les protéines de la capside.

Avant l'incubation avec le SDS et la proteinase K et après traitements au phénol, de l'ADN λ en quantité proche de celle présumée pour l'ARN dans le virion est ajouté aux PLRV purifiés provenant d'autres tiges et feuilles.

Une telle expérience présente clairement sur la figure 4, que l'ADN λ est quantitativement retrouvé tout comme l'ARN du PLRV (bande 1a ou 2a).

Une très fine bande dans la position de l'ADNλ et une tâche partant de cette position apparaissent sur le blanc de contrôle (bande 1b et 2b).

Elles reflètent la présence d'acide nucléique très hétérogène dans leur taille et de poids moléculaire plus élevé que celui de l'ARN du PLRV. Sa quantité est plus importante dans les PLRV extraits à partir des feuilles que des tiges (comparer la bande 2b par rapport à la bande 1b).

Cela varie d'une préparation virale à une autre et basé sur les données densitométriques observées sur les photos de gels, cela peut présenter 2 à 3 fois la quantité d'ARN de PLRV.

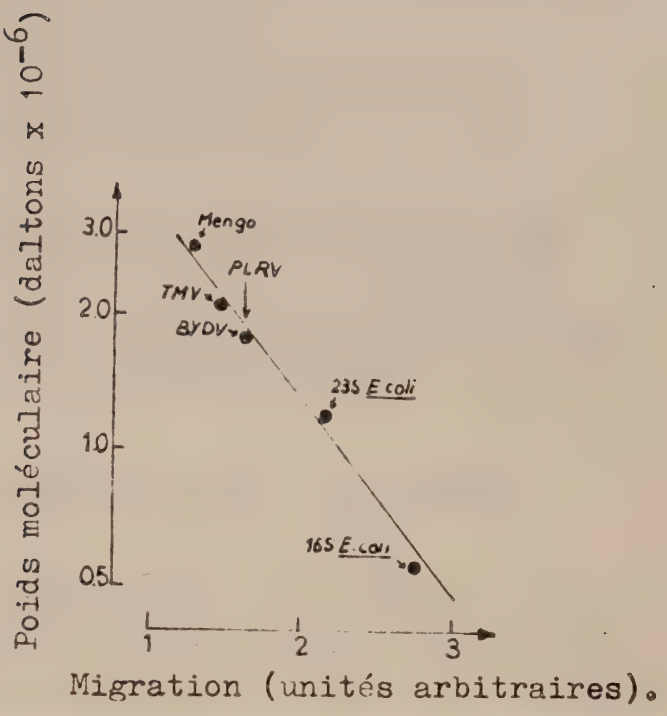


Fig. 7. Mobilité électrophorétique de VEPT RNA composé dans 2,5 % acrylamide 0,5 % de gel d'agarose comparé à ceux des échantillons cités section 2 - tracé semi-logarithmique : poids moléculaire des RNA contre migration.

Les renseignements se rattachant à la nature de l'acide nucléique responsable de la tache ont été fournis par l'expérience suivante : les virions de PLRV sont préincubés avec d'autres DNAses ou RNAses avant traitement au SDS et protéinase K et directement analysés par électrophorèse sur gel d'agar sans extraction au phénol ni précipitation à l'éthanol (Figure 5). La tache observée sur le blanc (bande 1) disparait après préincubation avec la DNAse (bande 2) tandis qu'elle n'est pas affectée par le traitement à la RNAse (bande 3).

Enfin, le traitement des virions par la DNAse permet d'éliminer la tache contaminante alors que la RNAse ne le permet pas.

La préincubation du virus avec la RNAse, précédant le traitement SDS - proteinase K a aussi été réalisé en présence de r ARN cytoplasmique de plantes hôtes. La figure 6 (bande 1a) montre que seuls les deux r ARN ajoutés sont hydrolysés et que l'ARN du PLRV apparait à une position très distincte de celles des autres r ARN (bande 1b).

De toutes ces expériences, il résulte clairement que :

1 . Les préparations de PLRV peuvent être contaminées par une grande quantité de matériaux hétérogènes sensibles à la DNAse, spécialement dans les cas de l'extraction du virus à partir des feuilles.

2 . Seul l'ARN est extrait du PLRV purifié comme molécule d'acide nucléique de taille homogène.

3 . L'ARN contenu dans le virion est résistant à l'activité de la RNAse dans les conditions où l'ARN exogène est hydrolysé.

Nous n'avons pas de renseignements bien déterminés en ce qui concerne la structure des molécules d'ARN du PLRV.

Leur poids moléculaire correspond à $1,8\text{-}1,9 \times 10^6$ daltons, à en juger par leur mobilité relative aux molécules d'ARN de tailles connues, sur gels non dénaturants (Fig. 7).

Discussion :

A partir de $< 100\,\mu g$ de virions de PLRV, nous pouvons extraire et identifier l'acide nucléique en tant qu'ARN, peut être à simple hélice et correspondant à des molécules homogènes de poids moléculaire environ égal à $1,85.10^6$ daltons.

Il pourrait être signalé que l'analyse par électrophorèse a plusieurs avantages en particulier si seulement de très petites quantités de

matériau non marquable (car les quantités sont trop faibles) sont utilisables.

Cette méthode est sensible (0,1-0,3 µg d'ARN ou bien d'ADN sont facilement mis en évidence) et fournit des renseignements utiles sur l'intégrité et la taille des molécules examinées. Qui plus est, cela permet de vérifier la pureté des préparations de virus et d'analyser le génome directement sans étapes intermédiaires, telles que l'extraction au phénol et la précipitation à l'éthanol pendant lesquelles le génôme pourrait être perdu.

L'ADN à double hélice a été décrit dans les préparations de PLRV à partir de feuilles et de tiges (1976 SARKAR). Son poids moléculaire $0,56.10^6$ daltons à été calculé à partir des données de sédimentation à l'équilibre et son existence en tant que molécule homogène n'avait pas été démontrée. Plus récemment le poids moléculaire de l'acide nucléique du PLRV a été estimé à $1,3.10^6$ daltons. Par électrophorèse sur gel nous n'avons pas observé d'acide nucléique dans les zones correspondant aux poids moléculaires d'une échelle restreinte de fragments d'ADN comme standards.

L'ADN préalablement signalé dans le PLRV pourrait correspondre à une contamination par une fraction spécifique d'ADN coupé de plantes hôte ayant des propriétés légèrement différentes de celles de l'ADN cellulaire total.

Donc le PLRV contient de l'ARN, la présence d'ARN dans le PLRV est un bon argument pour classer ce virus dans le groupe des Luteovirus qui contient déjà le BYDV et le virus occidental de la jaunisse de la betterave. Ces deux derniers virus contiennent des molécules d'ARN à simple hélice de poids moléculaire : 2.10^6 daltons (17.18).

F. EFFET DU LAURYL SULFATE DE SODIUM SUR LES PARTICULES VIRALES.

Le comportement d'un virus vis-à-vis du lauryl sulfate de sodium (SLS) permet de dégager des indications concernant le type d'interactions qui détermine la stabilité de la nucléoprotéine.

On sait que les virus à liaison RNA protéines stricts sont très sensibles au SLS.

Nous avons traité une suspension du VEPT par le SLS à des concentrations variant de 0,01 à 0,1 p. 100.

Les modifications structurales du virus ont été recherchées en analysant le comportement du virus dans un gradient de saccharose.

A partir de la concentration 0,01 p. 100 de SLS on observe une déstabilisation du virus qui se manifeste par une réduction de la constante de sédimentation d'une partie des particules.

A la concentration de 0,05 p. 100 (GRAPHIQUE 17) l'effet du SLS se manifeste aussi par une polydispersion des particules.

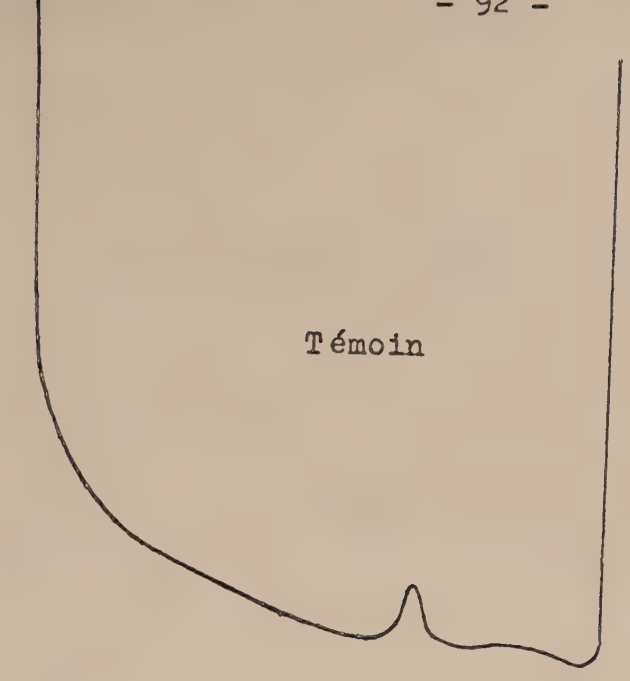
Enfin avec 0,1 p. 100 de SLS, le virus est complètement dégradé.

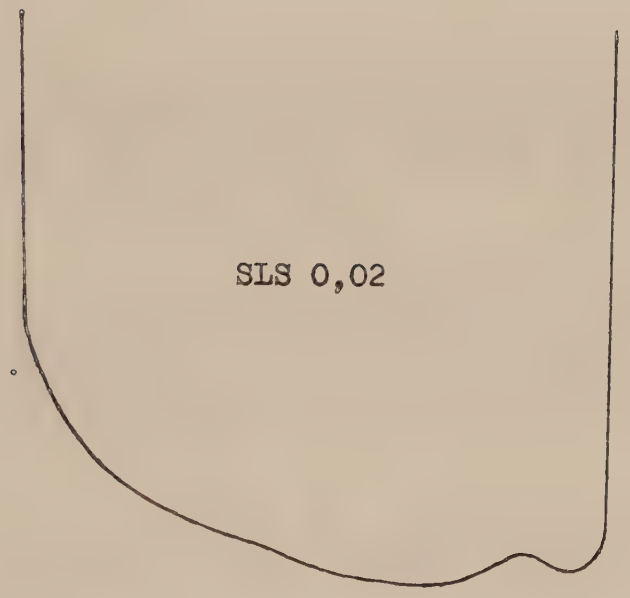
Cette sensibilité importante du virus au SLS montre que les liaisons RNA protéines jouent un rôle considérable dans la stabilisation des particules.

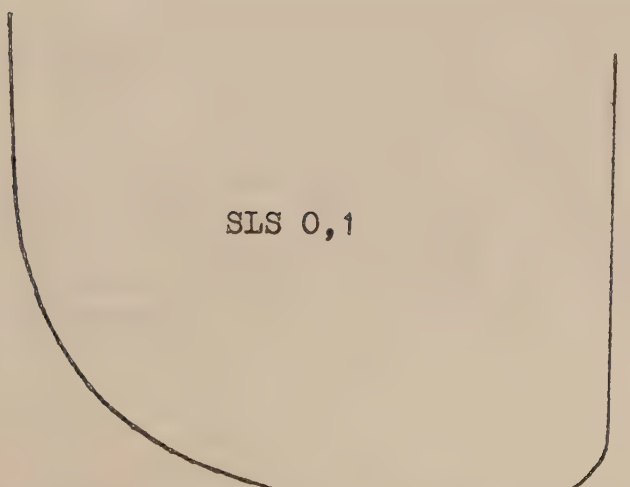
Le virus de la Mosaïque du Concombre est essentiellement stabilisé par des liaisons RNA protéines (BOATMAN et KAPER 1976) et présente une très forte sensibilité au SLS (environ 0,01 p. 100) ainsi qu'aux forces ioniques élevées (KAPER 1973).

Les particules du VEPT ne doivent pas leur stabilité uniquement aux liaisons RNA protéines,

En effet on a vu (I.1.) que ce virus pouvait être purifié dans un milieu à force ionique élevée. Cependant la forte sensibilité du VEPT au SLS, l'absence presque complète de particules pénétrées par l'acide phosphotungstique montrent que les liaisons RNA protéines jouent un rôle très important dans la stabilisation du VEPT.







GRAPHIQUE 17

Effet du SLS (30 min. à 70° C) sur la migration du VEPT (50 µg/tube) dans un gradient de saccharose.

CHAPITRE IV

PROPRIETES IMMUNOLOGIQUES du VEPT

En 1965, MURAYAMA et al ont pour la première fois essayé d'obtenir un antisérum contre le virus de l'Enroulement de la Pomme de terre, en utilisant un jus de plantes infectées, sans purification et sans concentration.

Ils ont utilisé le jus de plantes de Pommes de terre infectées, traité par une solution de Formaline et d'acide nitreux. Le jus traité était injecté par voie intrapéritonéale au lapin. Mais ces auteurs n'ont pas réussi à mettre en évidence une réaction positive.

C'est en 1973 que MURAYAMA et KOJIMA ont montré que des anticorps contre le virus PLRV pouvaient être produits par une préparation de virus purifiées. (KOJIMA-MURAYAMA 1972a).

KOJIMA nous a envoyé quelque quantité d'antisérum PLRV obtenu à partir des souches japonaises (du virus PLRV), le virus était purifié à partir des feuilles de Physalis floridana.

J'ai essayé plusieurs fois d'observer les réactions sérologiques de cet antisérum avec le virus purifié (à partir de souches cultivées à Versailles) de l'Enroulement de la Pomme de terre.

Mais l'antisérum n'a jamais réagi, il est possible que le sérum ait été inactivé au cours du transport.

A. PREPARATION DE L'ANTISERUM.

Le virus PLRV souche de Versailles (ou PL-ANTIGENE, Potato Leafroll Antigene) a été purifié à partir des fibres de tiges congelées et broyées avec de l'azote liquide, provenant de plants de Pomme de terre infectés appartenant à différentes variétés : Keltia - Etoile de léon - Buinch - Claudia - Clostar ...

Pour la purification du virus, on utilise la méthode de précipitation par 8 p. 100 PEG 6000 (l'explication se trouvant dans le 2e chapitre), Ultracentrifugation, puis le passage sur un gradient de saccharose. La préparation est contrôlée au microscope électronique.

Le dosage du virus est effectué au spectrophotomètre en se référant à l'absorption à 260 (0,1 p. 100 = 5 unités de D.O.)

La préparation du virus obtenu contient entre 10 à 100 μg de virus.

Le contrôle du pouvoir infectieux des particules purifiées s'effectue de la façon suivante :

Des pucerons (Myzus persicae Sulz) sont déposés sur une membrane de parafilm à travers laquelle ils peuvent s'alimenter (solution contenant du virus et du saccharose).

Transférés sur des plantules de Physalis floridana qui manifestent des symptômes de jaunisse et des ralentissements de la croissance (ROCHOW et BRAKKE 1964).

Après purification du virus, nous l'ajoutons volume à volume à un adjuvant complet.

Nous injectons entre 10 à 75 μg de suspension de virus par voie intramusculaire aux lapins.

Les injections sont répétées chaque semaine, pendant 5 semaines. Puis ensuite 2 ou 3 injections, total des injections allant jusqu'à 20 ou plus. Elles sont entrecoupées de prises de sang permettant de récolter l'antisérum. (Les premières prises de sang ont été effectuées à la veine de l'oreille de peur de tuer le lapin. Mais voyant qu'elles ne donnaient que des petites quantités d'antisérum une des prises de sang est alors effectuée dans la veine cardiaque.

On obtient alors une grande quantité d'antisérum qui est congelé et stocké. (pour finir le lapin est resté vivant).

B. TEST DE PRECIPITATION OU "RING TEST".

Pour effectuer les réactions sérologiques et éprouver les sérums nous n'avons pas utilisé le test de diffusion en gélose car il est trop dispendieux en sérum, mais nous avons utilisé le "ring test".

Le "ring test" est utilisé le plus souvent qualitativement, car c'est une méthode simple, rapide, ne nécessitant que des petites quantités de réactifs.

Cependant ce test peut-être utilisé quantitativement (WHITCOMB et BLACK 1961). Ces auteurs se sont servi de ce test pour estimer la concentration de l'antigène du virus à l'intérieur d'un insecte infecté.

Le titre de l'antisérum obtenu par le virus de l'Enroulement de la Pomme de terre est déterminé par la méthode de précipitation "ring test". L'antisérum a réagit avec une préparation du virus PLRV pur. Mais pour la protéine de plants sains (S antigène), l'antisérum ne donne aucune réaction.

Le virus purifié de l'Enroulement de la Pomme de Terre, le virus de la jaunisse nanisante de l'Orge (BYDV), qui a été extrait à partir de fibres de tiges de l'orge, infectés et également le virus de champignon de couche (BAB) que H. LAPIERRE m'a donné et qui me sert de témoin), ont été utilisés pour des études avec l'antisérum PLRV.

L'antisérum dilué dans du sérum physiologique, est utilisé en différentes concentration mélangé à 10 p. 100 de glycérol ou à 1 p. 100 de saccharose.

0,1 ml à 0,2 ml de cet antisérum sont pipettés à l'aide d'une pipette pasteur pour être déposés dans des tubes capillaires. Le même volume d'antigène (Virus PLRV, purifié, BYDV purifié, BAB champignon de couche purifié ceux-ci séparément) est déposé à la surface de l'antisérum très délicatement.

Les tubes sont incubé durant 10 à 15 minutes à la température du laboratoire de façon que les particules de virus et les anticorps puissent diffuser ensemble.

On obtient une excellente réaction de précipitation visuelle à l'intérieur du tube contenant le PLRV.

L'anneau obtenu est alors visualisé dans une chambre noire à l'aide d'une source lumineuse.

Les TABLEAU 16 - 17 montre le résultat de ces expérience de "ring test". Nous voyons que le virus purifié PRLV a la concentration de 15 μg/ml réagit avec le sérum du lapin n° 1 jusqu'à une dilution de 1/450 du sérum. Le sérum n° 2 est encore plus actif. Par contre aucun de ces 2 sérums ne présente de réaction positive avec un extrait purifié

effectué à partir de plantes saines et ne comprenant donc que des protéines normales.

Dans le TABLEAU 17, nous avons comparé les réaction données par 3 virus, un virus tout à fait différent, le virus bacilliforme du champignon de couche BAB et un virus qui devrait être apparenté : le virus de la Jaunisse Nanisante de l'Orge ; on observe que seul le virus de l'Enroulement de la Pomme de terre détermine l'apparition d'un anneau de précipitation avec son antisérum, le BAB n'en donne pas. Enfin, avec le VJNO, l'anneau de précipitation n'est visible qu'avec le sérum non dilué.

Nous concluons que bien qu'il soit possible que le PLRV et le BYDV présentent des motifs antigéniques communs la réaction en "ring test" avec un sérum non dilué est trop aléatoire pour se prononcer d'une façon catégorique.

C. TITRATION DE L'ANTISERUM PAR LA METHODE DE "RING TEST".

Comme nous venons de le voir le "ring test" permet d'effectuer une titration de l'antisérum.

On utilise alors le virus purifié à une concentration connue (15 µg/ml) de l'Enroulement de la Pomme de terre obtenu à partir des tiges de plants infectés.

Le titre de l'antisérum est élevé graduellement contre le virus PLRV purifié. Il est examiné jusqu'à ce que la précipitation dans les différentes dilutions d'antisérum ne soit plus obtenue.

La réaction de précipitation était respectivement de 1/600 contre l'antigène PLRV homologue et de 1/5 contre des protéines concentrées de Pomme de terre saines à 1 µg/ml.

TABLEAU 16 : Réaction sérologiques de PLRV antisérum avec les virus PLRV ou l'extrait de plantes saines. (page suivante).

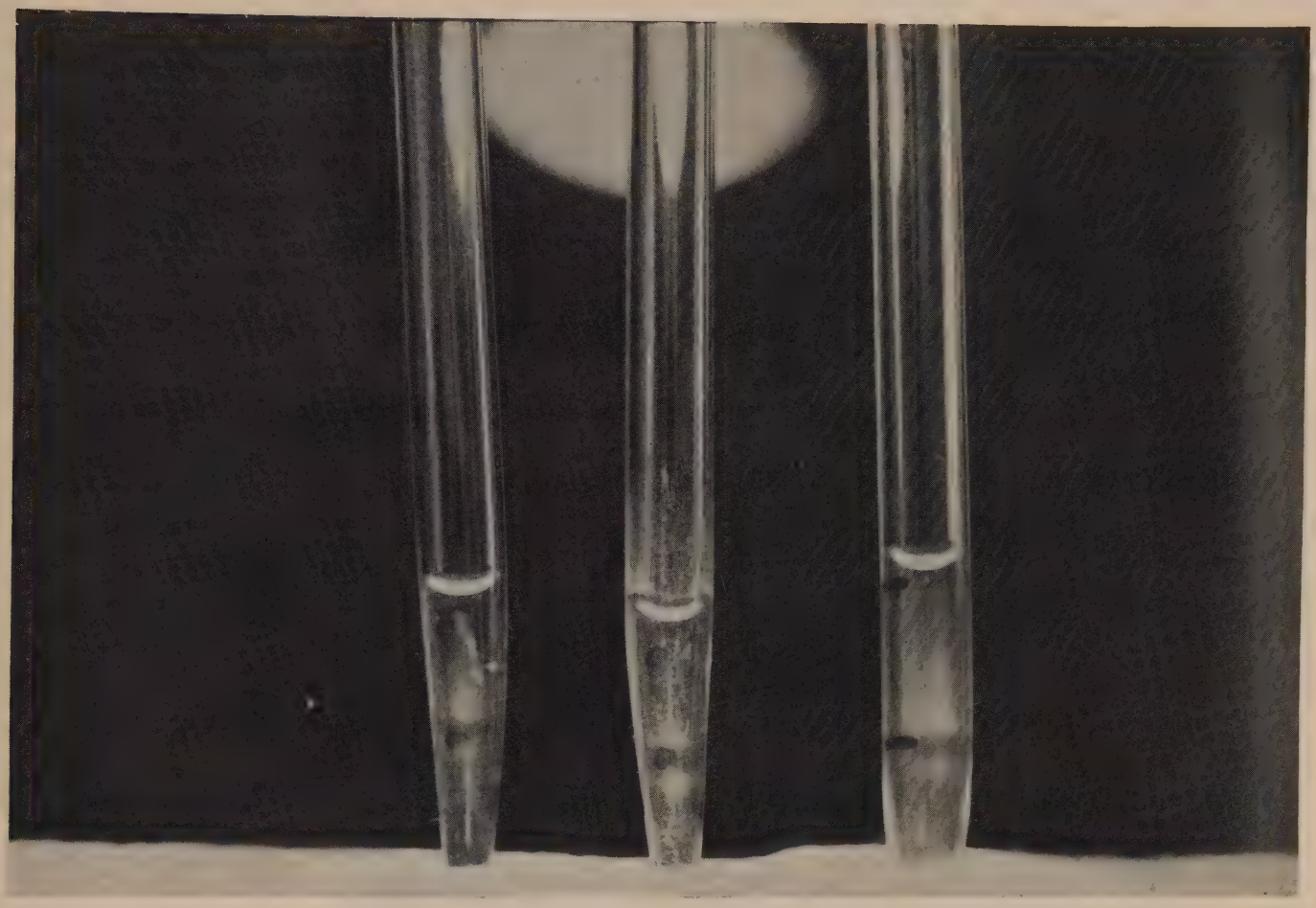
TABLEAU 16

Expériences	anti-sérum	lapins	Dilutions du sérum 1	10	25	50	75	100	150	200	250	300	350	400	450
Virus PLRV à la concentration 15 µg/ml	PLRV	n° 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	∓
	PLRV	n° 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Extraits de plantes saines	PLRV	n° 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	PLRV	n° 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABLEAU 17 Relations sérologiques entre le "Potatoe leafroll" et le "Barley Yellow Dwarf" virus (souche de Versailles)

Expériences	sérum	Virus	Dilutions			
	anti-sérum		1	10	20	30
1	PLRV	PLRV	+	+	+	+
2	"	BYDV	+	∓	-	-
3	"	BAB	-	-	-	-

PRECIPITATION DE L'ANTISERUM PLRV AVEC LES VIRUS BYDV 1/1 et PLRV 1/1 et 1/10.



	tube 1	tube 2	tube 3
	Virus BYDV	Virus PLRV	Virus PLRV
	anti sérum		
Anti sérum	PLRV	Anti S.PLRV 1/1	Anti S. PLRV 1/10

Précipitation des deux virus PLRV et BYDV, avec Pl - Antisérum.

PRECIPITATION du VJNO (BYDV) avec
le PL - Antisérum 1/1, PAR RING TEST.

D. EN CONSEQUENCE : Les résultats ont montré que le virus posséde une antigénisité. Il est donc possible d'obtenir de l'antisérum.
Les relations entre le virus PLRV et le virus BYDV ne sont par ailleurs pas à exclure. Pour mieux étudier les relations sérologiques, nous avons séposé dans des tubes pour ultracentrifugation sur gradient de saccharose SW 50 :

Le virus PLRV purifié seul, le virus BYDV seul, le virus purifié PLRV en présence de l'antisérum, et le virus purifié BYDV en présence de l'antisérum.

Ensuite on ultracentrifuge dans un ROTOR SW 50 à 40 000 tour/min. On passe dans un fractionneur ISCO.

Les résultats ont montré la disparition des pics de virus en présence de l'antisérum (soit précipitation des virus avec l'antisérum).

On peut dire que : 1 . L'antisérum préparé est très efficace contre les virus PLRV.

2 . La précipitation des 2 virus PLRV et BYDV avec Pl-Antisérum permet d'établir les relations sérologiques entre ces deux virus.

- Photographies page 98 et 99.

E. DETECTION DU VIRUS DE L'ENROULEMENT DE LA POMME DE TERRE PAR LA TECHNIQUE SEROLOGIQUE ELISA "Enzyme linked Immunosorbent Assay".

INTRODUCTION :

La technique sérologique ELISA, utilisé par VOLLER et al (1976) et par CLARK et ADAMS (1977) s'est montrée être un instrument extrêmement puissant pour détecter de manière très sensible les virus de plantes. (CLARK et ADAMS 1976, TRESH et al 1977, CASPER 1977).

Sous des formes variées les "enzymes-immunoessais"sont de plus en plus utilisés en pathologie et immunologie cliniques (FELDMAN et al. 1976).

Leur sensibilité est comparée à celles des radio-immunoessais (ENGVALL et PERLMANN 1971-1972).

Cette technique est très sensible non seulement pour la détection du virus à faible concentration mais aussi pour la différenciation d'antigènes viraux étroitement apparentés ainsi que pour leur recherche quantitative. L'efficacité de cette méthode pour son utilisation quantitative a été appuyée par plusieurs auteurs. Les méthodes sérologiques conventionnelles sont limitées par de faibles concentrations en virus, par la morphologie peu adaptée des particules ou par la présence, dans les extraits de plantes, de virus inactivateurs ou inhibiteurs.

Ces limites peuvent largement être surmontées par l'utilisation des plaques de microtitrages du test ELISA "Method of Enzyme Linked Immunosorbent Assay".

Son application est très étendue, détectant les particules isométriques et les virus filamenteux à la fois dans les extraits purifié et non traités des hôtes herbacés et des plantes infectées de récolte.

Dans cette méthode le virus de l'échantillon test est capté spécifiquement et immobilisé par son anticorps lui même absorbé sur une surface solide, plaque de microtitration en polystyrène, VOLLER et al (1974). Le virus capté est ensuite mis en réaction avec davantage d'anticorps sur lequel a été fixé un enzyme. Après lavage, l'Enzyme lié à l'anticorps, ayant formé un complexe avec le virus capté, est détecté par colorimétrie en ajoutant un substrat approprié à l'enzyme.

A l'encontre de presque toutes les autres techniques sérologiques, en virologie des plantes, qui sont basées sur la formation et la détection de précipités, le test ELISA repose sur la détection de réaction non précipitantes, rendue possible grâce à l'utilisation de complexe Enzyme-anticorps.

Il y a deux conséquences importantes à cette différence de principe de réaction : premièrement à des fins d'ordre pratique, l'efficacité de la technique ELISA est indépendante du rapport d'anticorps à l'antigène. Ainsi, une fois que les concentrations appropriées des préparations d'anticorps sont vérifiées, elles sont applicables aux tests suivants pour la détection du virus à toutes concentrations.

Deuxièmement, étant donné que la rétention d'enzyme lié à l'anticorps est fonction et proportionnelle à la concentration en virus, la technique ELISA possède un haut potentiel quantitatif dans chacune des parties différentes des tissus. Un tel résultat peut nous donner une méthode de calcul pour comparer directement les valeurs d'extinction des échantillons tests avec celles des dilutions de virus standards réalisées en parallèle. Il existe peu de méthodes réalisables qui peuvent fournir de tels résultats si facilement, particulièrement pour un grand nombre d'échantillons ou pour une très petite quantité de tissus.

On prépare des antisérum de titre 1/500 et 1/200 qui sont suffisamment spécifiques pour être utilisés dans le test ELISA. Avec ce test, le virus de l'Enroulement de la Pomme de terre (PLRV) peut être détecté dans les différentes parties des plantes infectées de Pomme de terre et dans son vecteur : Myzus persicae.

Les matériaux de plantes de Pomme de terre à utiliser dans ce test sont les tiges, les feuilles (nervures de feuilles, partie mésophylle), les racines, les tubercules, le collet, le stolon et le puceron Myzus persicae.

Les échantillons sont broyés au mortier dans un volume de sérum physiologique tamponné, additionné de Tween 20 à 0,05 p. 100, le résidu éventuel sur l'étamine est soumis à un deuxième broyage. Les plaques de microtitration sont recouvertes pendant 4 h à 37°C. d'une première couche d'immunoglobulines à la dilution de 1 μ g/ml.

La deuxième couche d'immunoglobulines couplées à l'enzyme est déposée également pendant 4 h à 37°C à la dilution 1/300. Entre ces deux couches, l'échantillon séjourne dans le puits pendant 1 nuit à 6° C. Dans ces conditions, tout extrait de plante saine donne une réponse négative.

Le dosage du virus dans les échantillons est rapporté à une gamme de référence de virus purifié traité simultanément pour éliminer tout facteur de variation inhérent à la qualité des plaques de microtitration.

A partir de ce virus purifié, nous avons établi une courbe d'étalonnage de la méthode de dosage sérologique. (GRAPHIQUE 18).

La courbe montre que le pouvoir de résolution de la méthode ELISA, déterminé par dilution du virus purifié, est de l'ordre de 10 ng/ml.

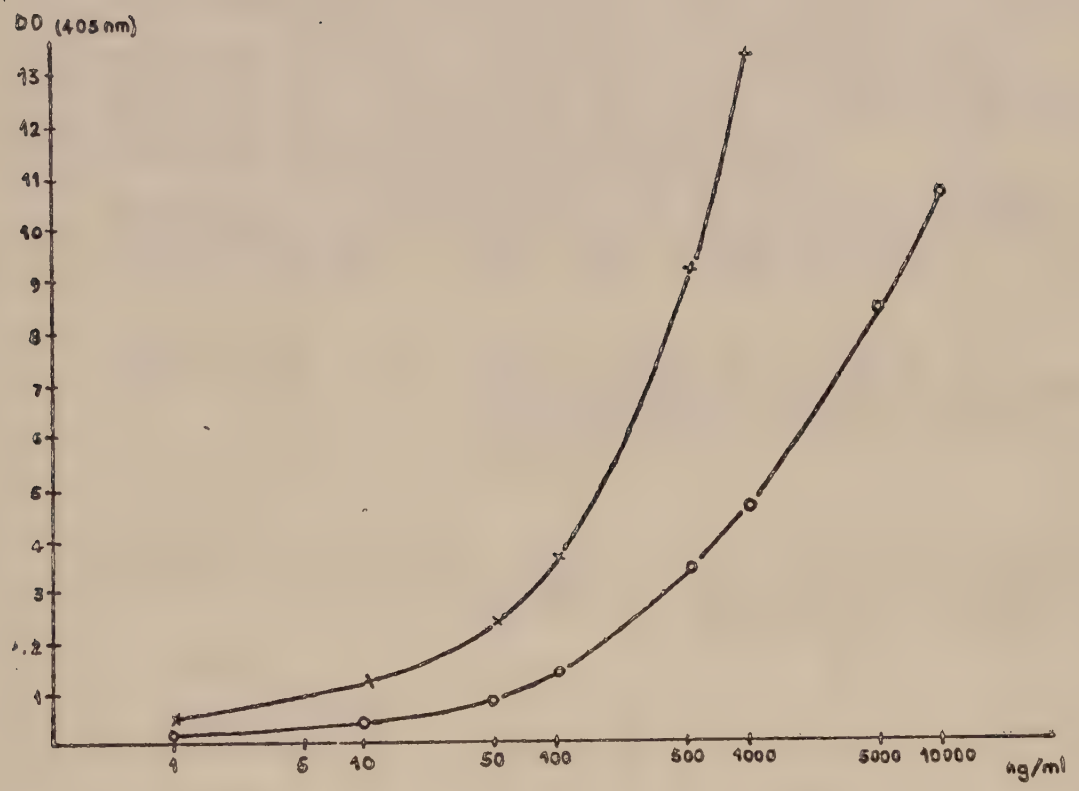
Pour préciser la nature de l'antigène dosé par cette méthode, une recherche d'antigène soluble a été conduite de la façon suivante : 10 g de tiges de Pomme de terre atteinte d'Enroulement sont broyés dans 35 ml de tampon phosphate 0,01 M, pH = 7,4 additionné ou non de Tween 20 à 0,05 p. 100 après ultracentrifugation de 2 h à 100 000 g, le surnageant est recueilli et le culot remis en suspension dans 35 ml de tampon additionné de Tween. Que le broyage s'effectue en présence ou en absence de Tween, le test ELISA est positif pour l'extrait initial et le culot en suspension jusqu'à la dilution 100 (volume en millilitres par poids de tiges en grammes).

En vue de préciser les conditions optimales de l'utilisation du test ELISA pour le diagnostic du virus divers essais ont été réalisés.

RESULTATS DU TEST ELISA :

a . Toutes les expériences ont été effectuées à partir du sérum de deux lapins de titre 1/500 et 1/200. Les deux antisérums ont donné des résultats excellents.

Les expériences ont été réalisées avec différents matériaux comme cela a été expliqué ci-dessus : matériel de plantes tel que la mésophylle, nervures, tiges, racines, collet, tubercules, germe, avec le tampon phosphate (PO4 - Na2 + K) (pH = 7,2, 7,3) M = 0,01, contenant 10^{-2} M EDTA ou non, avec aussi certaines expériences, présence de SLS à 0,05 p. 100 ou bien SLS + tween à 0,05 p. 100 ou sans SLS, ou encore avec l'amylase 0,05 p. 100.



Courbe d'étalonnage du test Elisa pour le Virus de l'Enroulement de la Pomme de terre. En abscisse, la concentration en virus exprimée en nanogrammes par millilitre. En ordornée, la densité optique mesurée à 405 nm ; O, lecture après 30 mn d'incubation ; ×, lecture après 1 h d'incubation.

GRAPHIQUE 18

Les résultats ont montré que :

1 . La présence d'EDTA n'a pas d'effet restrictif, le virus n'est pas dégradé par l'EDTA.

2 . La présence de SLS a un effet inhibiteur

3. L'amylase pour les tubercules n'a pas été efficace.

Les très petits germes de tubercules n'ont montré aucune présence de virus ; Par contre les germes plus gros en sont très riches.

Quand la plante est très petite, la quantité de virus est faible la dilution limite n'excède pas 1/5e. Quand la plante a atteint 10 cm, la détection de PLRV au niveau des nervures de feuilles et des tiges est très bonne.

Le PLRV a aussi été détecté par le test ELISA dans le collet et les stolons, ce qui n'a pas été obtenu pour le PYV. Voir schéma suivant.

TABLEAU 18 : Concentration du Virus de l'Enroulement de la Pomme de terre dans différentes parties de la plante.

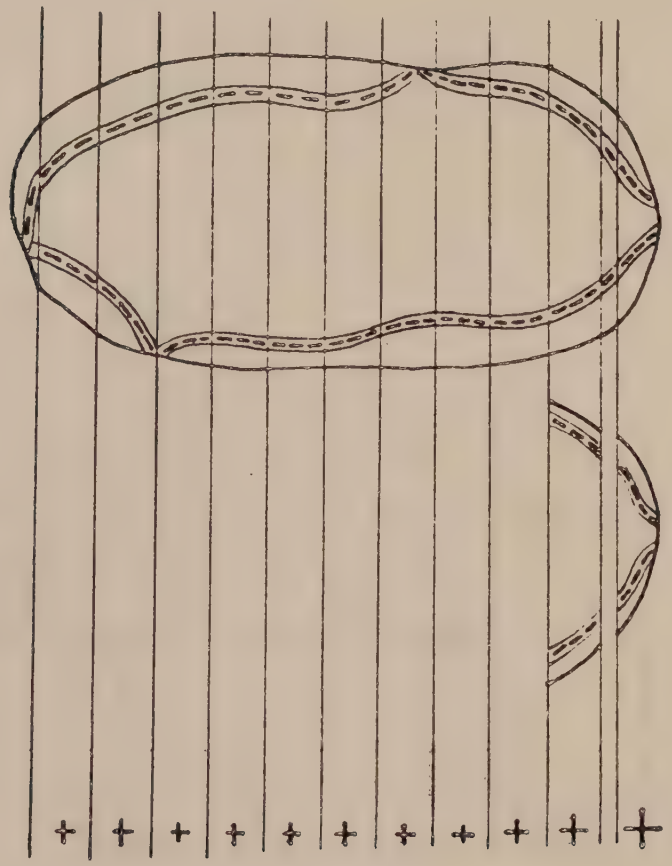
	1r broyage	broyage du résidu	total
LIMBE	40	5	45
PETIOLES	65	135	200
TIGES	310	1335	1645
RACINES	810	=	810

Les résultats sont exprimés en ng/g de poids frais.

Nous précisons qu'avec les résultats obtenus pour le PLRV, la méthode ELISA est efficace pour sélectionner les plantes contre cette maladie et d'autres qui affectent les récoltes de Pommes de terre.

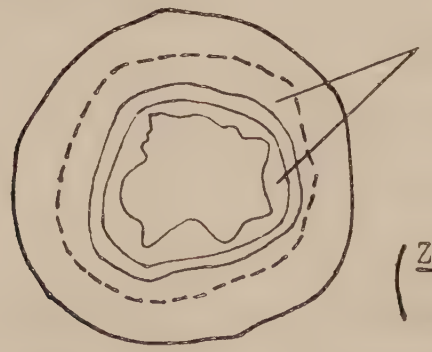
D'un point de vue qualitatif, la méthode proposée est le premier diagnostic rapide de l'Enroulement de la Pomme de Terre. Par ailleurs, la corrélation observée entre concentration en virus et proportion de tissu vasculaire confirme très largement les caractéristiques virologiques de ce virus, déduites des temps d'acquisition et de contamination par les Pucerons. En particulier, les racines apparaissent

TUBERCULE MATURE



ELISA + + + + + + + + + + +

STOLON MATURE



SECTION STOLON MATURE

SCHEMA 3

ESTIMATION CONCENTRATION PLRV µg : kg (ou ng : g)

	Aphids	Physalis	Datura	Potato	Potato				
					feuille	TIGE	racine	stolon	
PETERS	5								
KOJIMA		20							
SARKAR		300-400							
HEPP			110		3000	4000		7000	
MEHRAD				30-100	11 000	11 000	3000	20 000	3000
CASPER					++	+	+++		-+
	PURIFICATION				ELISA				

TABLEAU 19

bien comme une source importante de virus, ce qui est en contradiction avec les déductions antérieures basées sur les tests de transmission par Puceron.

Ce résultat souligne la logique de la méthode de purification proposée.

Un dosage du virus Y de la Pomme de terre par la même méthode indique une concentration maximale de 80 $\mu g/g$ de feuilles. Cette différence d'un facteur 50 entre les concentrations en Potyvirus et en Lutéovirus dans les tissus respectivement les plus riches en virus souligne la nécessité d'employer pour le dosage du Virus de l'Enroulement une méthode quantitative de résolution élevée. En toute rigeur, la méthode ELISA permet théoriquement de doser la proteine virale qu'elle soit isolée à l'état de sous-unités ou assemblée en particules du virus et aucun antigène soluble n'est mis en évidence après ultracentrifugation d'un extrait de tiges infectées : il est donc possible de conclure à un dosage du virus.

Ainsi, ces résultats constituent les premières données de concentration réelle et de rendement de purification pour un Luteovirus : pour l'Enroulement de la Pomme de Terre, elles sont largement supérieures à celles suggérées par la seule approche disponible jusqu'à maintenant, à savoir la purification, dont le rendement apparaît voisin de 1 p. 100.

F. CONCLUSION DU TEST ELISA.

Les résultats du test ELISA montrent que cette méthode peut fiablement être utilisée pour tester les feuillages de deuxième infection des Pommes de terre cultivées en serre, les Pommes de terre cultivées dans les champs et les plantes à infection primaire.

Le test ELISA donne aussi des résultats satisfaisants comme test de comparaison entre les germes sains et infectés dans le but de les cultiver ou non.

Cette détection au niveau des tubercules peut avoir une incidence sur la pratique de sélection et d'amélioration des plantes et présente donc un grand interêt.

Le procédé par les plaques de microtitrage est particulièrement adapté pour tester les échantillons de champs à une grande échelle, comme cela peut être nécessaire par exemple lors de l'inspection des maladies dues aux virus ou bien pour des investigations épidémiologiques.

Sa sensibilité à la détection directe des virus dans les extraits de plantes pourrait faciliter les études agricoles de ces virus pour lesquels des méthodes de détection suffisantes et pratiques n'ont pas été efficaces.

Même pour les virus détectables traditionnellement par diffusion sur gel, la sensibilité plus grande du test ELISA devrait permettre de tester des lots d'échantillons et de détecter une infection très faible dans les récoltes.

CHAPITRE V

LOCALISATION et CONCENTRATION du VIRUS dans la PLANTE

A. DONNEES ULTRASTRUCTURALES.

KOJIMA et al (1968-69) et ARAI et al (1969) ont publié des résultats d'expériences réalisées sur des sections ultrafines "ultrathin sections" de plantes hôtes du virus de l'Enroulement de la Pomme de Terre : Datura Stramonium, Physalis floridana et solanum Tuberosum, récoltées aux champs et infectées avec le PLRV.

Pour les trois plantes, ils ont trouvé, dans le phloème des pétioles, une accumulation de virus dans un arrangement remarquable, à l'intérieur des vacuoles centrales des cellules de phloème.

Un tel arrangement cristallin des virus est rarement retrouvé dans les cellules de plantes vieilles et malades. Les nervures des feuilles contiennent des particules de virus, mais il n'en existe jamais dans les cellules du mésophylles.

Donc la faible concentration en PLRV, dans le jus des plantes infectées, est due au fait que la distribution du virus est limitée aux faisceaux fibrovasculaires "fibro-vasculair bundle", spécialement le tissu phloèmique.

Pour notre étude de la localisation du PLRV dans les tissus, nous avons réalisé des coupes ultra fines à l'INRA dans le laboratoire de Madame MICHON et avec sa collaboration.

Coupe Ultra fine et coloration :

"Ultrathin section and staining"

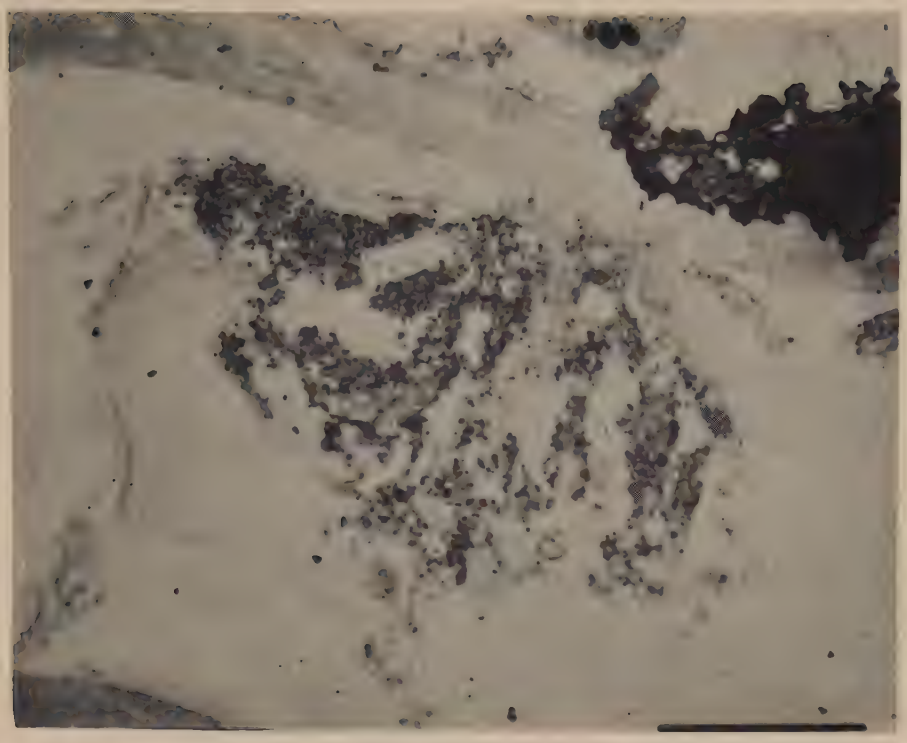
Les sections sont coupées très finement par un porter-Blum ME-1 ultramicrotome, équipé avec un couteau de diamant très tranchant et sont teintée avec de l'acétate d'uranyl à 3 p. 100 pendant 30 minutes.

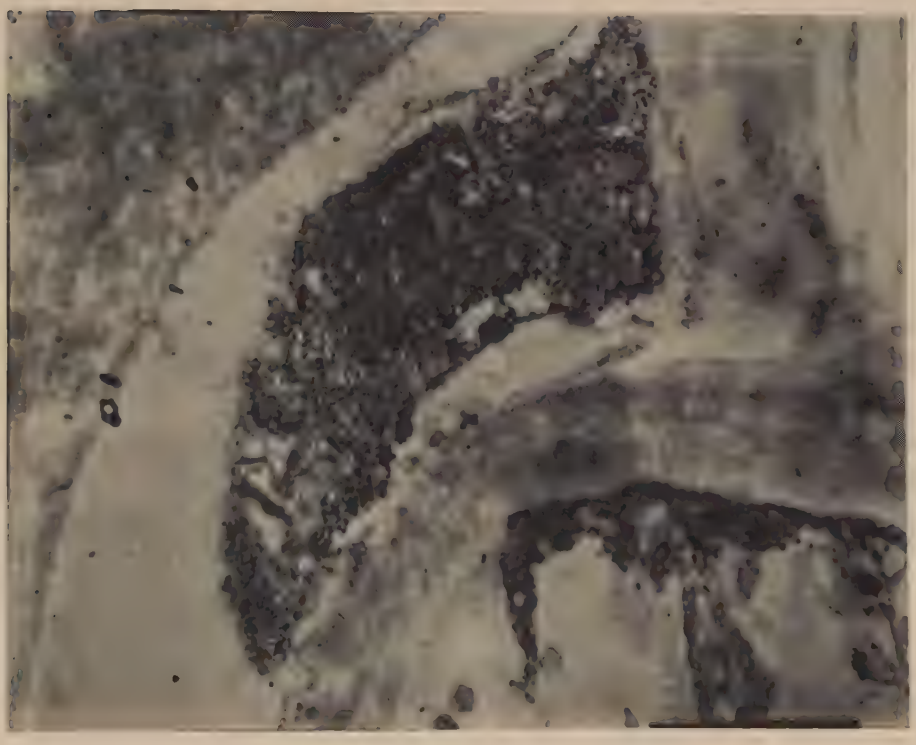
Après un lavage à l'eau distillée, les tranches sont très finement coupées jusqu'à leur donner une teinte grisâtre, ce qui correspond à une épaisseur d'environ 300 à 400 A°.

Ces sections dilatées dans un bain d'eau distillée sont recueillies sur des grilles par un mouvement ascendant.

La grille est ensuite immergée pendant 5 minutes dans une préparation aqueuse d'acétate d'uranyl à 5 p. 100 (conservée à l'abri de l'air), à la température du laboratoire et enfin rincée.

L'examen en microscopie électronique (modèle Philips A 300) des sections ultrafines de plantes de Pomme de terre infectées avec le VEPT, montre que le virus de l'Enroulement de la Pomme de Terre est localisé dans le phloème et non dans le mésophylle. L'accumulation des virus VEPT, uniformes de taille et rassemblés en concentration massive dans les cellules du phloème est remarquablement montrée dans les photographies prises au cours de cette étude.
(photographies page 113).





Coupe Ultra fine. Cellules de phloème de pétiole de plante de Pomme de terre, dans lesquelles les particules du virus sont accumulées.

B. DONNEES OBTENUES PAR PURIFICATION DIRECTE.

Les essais précédents, pour purifier le PLRV, montrent que dans les conditions maximales de propagation une petite quantité de virus a été obtenue.

La quantité de virus estimée à partir des vecteurs : Myzus persicae Sulz, infectés avec le PLRV artificiellement, est de l'ordre de 5 µg/kg (PETERS) et à partir des tissus de Physalis floridana, la quantité varie de 0,01 à 0,02 mg/Kg (KOJIMA et al, 1974). SARKAR a obtenu à partir du même matériel 0,3 à 0,4 mg/Kg en 1976.

Dans notre expérience nous avons obtenu des quantités variables de 0,03 à 0,1 mg/kg..Pour obtenir la quantité maximale de virus dans la méthode de purification, cela dépend des éléments utilisés (plantes, réactifs et méthodes).

Auparavant, on n'utilisait pas, pour la purification des plantes de Pomme de terre en raison de leur aptitude à l'infection par d'autres virus, ce qui a d'ailleurs posé d'énormes problèmes pendant une année dans cette étude.

Pour cette raison, nous avons cherché à obtenir des germes de Pomme de terre complètement sains, infectés artificiellement puis cultivés en serre isolée.

Le premier jus pour les tiges, le premier et le deuxième pour les feuilles sont très concentrés en chlorophylle, en autres constituants des cellules de plantes et en matériaux phénoliques. Nous avons donc opéré des extractions, comme cela a été expliqué dans le deuxième chapitre.

A partir de la deuxième extraction de tige et de la troisième pour les feuilles, la quantité de virus est meilleure.

Cependant on constate que la quantité de virus dans les tiges est plus importante que dans les feuilles. De plus la qualité des virus extraits des tiges est meilleure pour réaliser les expériences biochimiques. (GRAPHIQUE 7).

La quantité de virus obtenue dépend aussi de l'âge des plantes : jeunes, la quantité de virus obtenue est plus grande dans les fibres bien développées des tiges et dans les nervures des feuilles d'une plante jeune ou mature que dans le matériel de plantes vieilles, dégénérées en qualité et en qualité de tissus et cette quantité décroit rapidement jusqu'à une très faible concentration quand les plantes sont très âgées.

La purification de feuilles aussi jeunes que possible montrant des symptômes d'Enroulement, ayant une couleur rosée, a donné de bons résultats, meilleurs qu'avec les feuilles matures et vieillies.

La quantité de particules de virus obtenue par purification de feuilles dépend de la séparation la plus complète des nervures de la partie mésophylle des feuilles.

Les fibres de tiges jeunes ne sont pas retenues dans l'étamine alors que celles des plantes matures, plus fermes, y restent davantage.

Pour cette raison, dans le premier jus d'extraction des tiges et des nervures de feuilles de plantes jeunes il est possible d'obtenir des virus, mais la quantité et le poids du résidu sur l'étamine sont moins importants que ceux des plantes matures.

Donc, le poids de résidu obtenu, riche en fibre à partir des plantes matures, est plus grand que pour les plantes jeunes, mais la quantité finale de virus obtenue est bonne mais moins importante. Pour les plantes vieilles, la quantité de résidu est grande mais très peu riche en fibres et par conséquent la quantité de virus obtenue est négligeable.

La quantité de virus obtenue après un long temps de congélation est bien plus faible que dans le même matériel utilisé pour sa purification après sa récolte ou bien après une semaine de congélation.

Cependant la faible concentration de PLRV obtenue dans les tissus de plantes est due à sa localisation dans les tissus de phloème qui existe en faible quantité dans les plantes.

C'est pourquoi il faut utiliser des poids importants de matériel de plantes.

Aussi quand une plante est jeunes, ses fibres bien développées, après une infection méthodique et avec des opérations très soigneuses à chaque étape de la purification, on obtient des résultats maximum en virus comme cela est montré dans les tableaux et graphiques précédents.

(GRAPHIQUE 10 - GRAPHIQUE 13 - GRAPHIQUE 15a et 15b).

C. DONNEES SEROLOGIQUES.

CASPAR a conclu que dans les racines de Pomme de terre cultivées dans les champs et récoltées en septembre, on trouve une concentration en virus dix fois supérieure à celle trouvée dans les feuilles sans pétioles ni nervures centrales (limbe) (CASPAR 1977).

Dans notre expérience, comme cela a été montré dans le test ELISA, la concentration en virus dans les racines de pommes de terre récoltées dans les champs et infectées dans une serre isolée, est vingt fois plus grande que dans le limbe internervaire.

Dans les nervures principales et les pétioles, les résultats obtenus par CASPAR, correspondent à celui obtenu pour les nervures de feuilles et pétioles et à un résultat supérieur à celui obtenu dans le limbe.

Après le premier broyage, les fibres de tiges ne sont pas broyées par conséquent la quantité de virus n'est pas grande, mais supérieure quand même à celle obtenue à partir des autres parties de plantes.

Après le broyage du résidu de tige (2e broyage) ; en présence d'azote liquide, le broyage est très fin et la quantité de virus obtenue est au moins quatre fois supérieure à celle après le premier broyage (voir tableau dans le test ELISA).

Nous devons donc utiliser des plantes dans lesquelles les fibres sont bien développées pour obtenir une quantité importante de virus.

Dans les racines de physalis floridana, le PLRV est trouvé essentiellement dans les faisceaux vasculaires, plutôt que dans le cortex des racines.

C'est encore une preuve que la localisation du virus est surtout dans le phloème.

SARKAR en 1976 a publié que dans le limbe des feuilles des plantes de Physalis floridana, se trouve la plus grande concentration de PLRV. Or selon le test ELISA réalisé par CASPER 1977 sur la plante Physalis floridana, la quantité de virus n'est pas importante dans le limbe mais la concentration maximale est trouvée dans ses racines.

Dans notre expérience et dans celle de ROWHANI 1979 et RICHARD STACE SMITH (University of british Columbia, Canada), la quantité de virus

dans les plants de Pomme de terre est bien meilleure que dans les Physalis floridana.

Dans les tiges de Pomme de terre, bien développées, on obtient, après la 2e et la 3e extractions des virus non contaminés par l'acide nucléique des cellules de feuilles ce qui permet une très bonne analyse biochimique.

Pour obtenir une concentration maximum en virus à partir des racines de Pomme de terre, se référer à la suggestion du CHAPITRE II.

Pour toutes les plantes hôtes du PLRV, quand les cellules de phloème vasculaire sont bien développées soit dans les feuilles, les tiges (de Pomme de terre) ou bien dans les racines (de Physalis floridana), on peut obtenir une quantité et une qualité importante de virus purifiés. Cette conclusion donne la possibilité d'un choix visuel pour déterminer les parties des plantes les plus favorables à la purification.

Avec de très bonnes méthodes de purification, une infection systémic et des plantes jeunes, on peut obtenir par le test ELISA 100 μ g de PLRV pour 1 Kg de matériel de plants frais.

Le BYDV a aussi été localisé dans les tissus de phloème (Jensen 1969).

La similitude de localisation et de cytopathologie et du BYDV et du PLRV est responsable de la petite quantité des 2 virus purifiés qu'il est possible d'obtenir.

D. CONCLUSION.

Les résultats montrent que les virus isolés sont présents dans le système vasculaire et non dans les cellules de l'épiderme et du mésophylle des plantes.

Ce caractère est particulier au LUTEOVIRUS (Jaunisse Nanisante de l'Orge, Enroulement de la Pomme de Terre, "Beet Western Yellows", "Carrot red leaf", Jaunisse Apicale du Pois).

CHAPITRE VI

MISE en EVIDENCE IMMUNOLOGIQUE du VEPT

A. DIAGNOSTIC DU VIRUS DE L'ENROULEMENT DE LA POMME DE TERRE DANS LA PLANTE DE POMME DE TERRE.

Etant donné que la Pomme de terre est propagée végétalement par ses tubercules, le virus inoculé est transporté d'année en année et les plantes cultivées à partir de tubercules infectés servent de nouvelles sources pour la propagation des virus.

D'ailleurs, les virus introduits dans les parties aériennes, mécaniquement ou par leur vecteur atteignent les tubercules assez rapidement (BEEMSTER 1961).

Le coût élevé des semences de Pomme de terre de bonne qualité, accentua l'importance d'une estimation sérieuse de la fréquence des virus dans les stocks de plantes de Pomme de terre cultivées.

Le VEPT et le virus de la Mosaïque de la Pomme de terre (PVY) sont deux pathogènes ayant un effet considérable sur les récoltes de Pommes de terre. Le PLRV provoque une maladie plus grave que le PYV, mais dans certaines régions, le PYV cause autant de dégâts.

Les expérience réalisées avec le test colorimètrique Igel-Lange sur tubercule ont été réalisées dans de nombreux pays d'Europe. La mauvaise fiabilité de cette méthode, est à l'origine de son abandon.

Malheureusement jusque là, les diagnostics sérologiques pratiques pour les autres virus ne peuvent pas être appliqué pour la recherche du VEPT. En effet les antisérums PLRV réalisés par KOJIMA, puis MEHRAD ET LAPIERRE, ainsi que SARKAR n'apportaient par les méthodes classiques, de réaction positive que si l'on utilisait comme antigène des extraits concentrés de plantes infectées.

B. OBSERVATION DES SYMPTOMES DANS LES PLANTES DE POMME DE TERRE.

On a pu observer (Partie Importance Economique) sur des cultures de Pommes de terre atteintes par le VEPT, des baisses de rendement allant d'un tiers à la moitié par rapport à la normale.

Lorsque l'inoculation est précoce (début de végétation), l'infection virale entraine l'apparition d'un Enroulement caractéristique des feuilles supérieures mais sans symptômes de nanisme.

Si le virus est répandu par les pucerons tard dans la saison de croissance, les plantes nouvellement infectées ne présentent pas les symptômes caractéristiques (typiques). Les tubercules de ces plantes infectées tardivement, s'ils sont utilisés comme semence, donneront des plantes malades lors de la germination de tubercules infectés, il faut attendre un mois avant de pouvoir observer les symptômes caractéristiques de la maladie.

C. OBSERVATION DES SYMPTOMES SUR LES PLANTES TEST.

L'observation à partir de plantes tests ne peut être utilisée dans des tests de base pour le VEPT. La plante test doit être inoculée par le puceron et ce procédé prend du temps et de l'espace.

La plante test est pratique pour de petites expériences et le meilleur hôte est Physalis floridana qui est très sensible à ce virus. Cette plante montre un arrêt de croissance nette, une décoloration et un enroulement environ 7 à 14 jours après l'inoculation.

Physalis angulata peut être aussi utilisé, mais il est moins sensible.

Datura Stramonium réagit avec une décoloration et un peu d'enroulement.

D. OBSERVATION EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

L'observation directe en microscope électronique des petits virus isométriques n'est pas aussi facile que celle des virus filamenteux ou même des particules sphériques plus larges, avec la méthode à immersion et coloration négative avec le microscope électronique.

Le PLRV à particules petites, isométriques pleines en faible concentration est difficile à distinguer de certains constituants de cellules contenus dans les préparations brutes.

Donc il ne peut être détecté par toutes les méthodes communes de microscopie électronique à partir des jus de plantes infectées. On a été ainsi amené à rechercher une méthode simple pour le diagnostic du VEPT.

E. DIAGNOSTIC PAR IMMUNOELECTROMICROSCOPIE (IEM)

KOJIMA (1978) a expérimenté la méthode d'agglutination (clumping) et la méthode de DERRICK (1973) (fixation des γ globulines sur une grille carbonée puis suivi d'un dépôt d'un extrait de plante).

Ces deux méthodes permettent de retenir efficacement le petit nombre de particules contenue dans l'extrait de plante. On peut encore améliorer la mise en évidence en effectuant une décoration (dépôt d'une couche de gamma globulines) et éventuellement une superdécoration (γ globulines antiglobulines).

L'immunoélectromicroscopie est une technique rapide mais qui exige l'emploi d'un microscope électronique.

Nous avons utilisé la méthode ELISA qui a l'avantage par rapport à l'IEM d'accroitre l'objectivité du diagnostic grâce à la lecture automatisée de la D.O. du substrat hydrolysé.

Cependant nous n'avons pas comparé systématiquement les deux méthodes.

Le TABLEAU 20 montre qu'à partir d'un extrait de plantes infectées il est possible de détecter le VEPT après une dilution au 1/100.

On considère qu'une réaction est positive lorsque la densité optique marquée est supérieure au double de celle de la plante saine.

Un certain nombre de problèmes restent à régler en ce qui concerne la mise en routine de ce type de test (origine de l'extrait de plante : tubercules, racines,...) mais d'ores et déjà on peut penser qu'il prendra une extension considérable.

F. CHEZ LE PUCERON VECTEUR MYZUS PERSICAE.

Détection du VEPT chez Myzus persicae.

Les relations virus pucerons chez les luteovirus (VJNO) sont de type persistant-circulant.

Ce caractère nous a encouragés à tenter une détection de type immunoenzymatique chez M. persicae ayant acquis le VEPT.

Dilution	plants infectés	plants sains
	1,700	0,1
1/10	1,100	0,054
1/20	0,8	0,037
1/50	0,3	0,032
1/100	0,1	0,021

TABLEAU 20

Détection en ELISA du VEPT dans un extrait foliaire de pomme de terre.

Cette expérimentation étant d'autant plus souhaitable que les expériences de STEGWEE et PONSEN (1958) faisaient penser que le VEPT était plutôt de "type multipliant" ou simplement se multipliait dans ou chez ce puceron.

Nous avons donc fait acquérir des temps variables le VEPT sur Pomme de terre du M. persicae.

Les pucerons sont ensuite transporté sur Chou plante immune, soit congelés avant d'être analysés.

a. Mesure de l'acquisition du VEPT par M. persicae.

Dans cet essai les pucerons aptères sont utilisés au stade 2 à 3.

Pour chaque temps d'acquisition 20 pucerons sont maintenus sur la plante infectée.

Les résultats consignés au TABLEAU 21 montrent qu'il est effectivement possible de détecter le VEPT dans les pucerons ayant acquis le virus au moins 3 jours (Densité optique double du bruit de fond).

b. Evolution de la concentration du virus lorsque les pucerons sont éloignés de la plante source.

Cette expérience a porté sur des pucerons ayant séjourné 1, 2 ou 3 jours sur une plante infectée puis transférés sur des Choux.

Dans aucun cas on ne peut observer une augmentation de la concentration virale (indiquée par la D.O. obtenue pour le dosage immunoenzymatique) dans les pucerons transférés sur Chou. (TABLEAU22).

Ces résultats supposent qu'il n'y a pas de multiplication du virus sur le puceron, mais plutôt une diminution de la concentration virale dès qu'il quitte la plante source.

Ces résultats préliminaires permettent les remarques suivantes :

Grâce au test ELISA on peut détecter le VEPT après 3 jours d'acquisition. Avec des lots de pucerons plus importants, on doit arriver à mettre en évidence le VEPT.

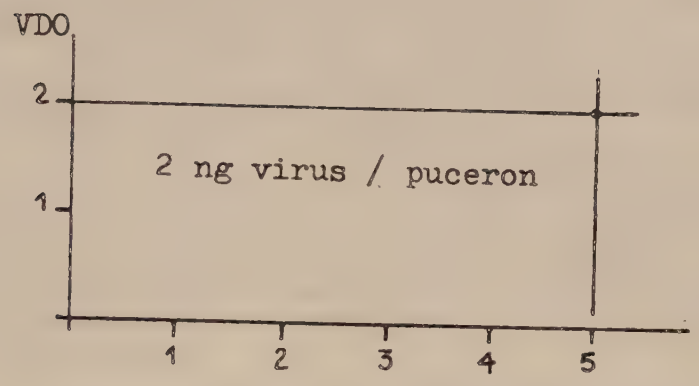
Nombre de jours d'acquisition	Temps de séjour sur Chou après acquisition sur Pomme de terre.					
	0	1	2	3	4	5
0	0,05					
1	0,06	0,06	0,06	0,045		
2	0,1					0,06
3	0,140	0,055				
4	0,180					

TABLEAU 21

Mesure en ELISA du VEPT acquis par M. persicae sur pomme de terre.

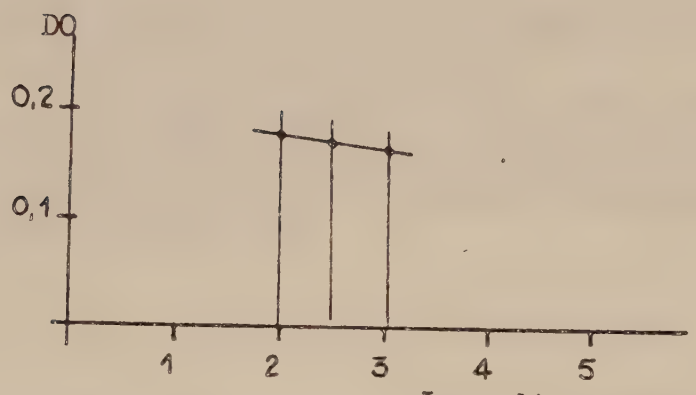
CONCENTRATION DE VIRUS DANS LE PUCERON

a)



Souche Myzus persicae de Pomme de terre

b)



Souche Myzus persicae transmettant efficacement le virus EPT.

TABLEAU 22

après 2 jours d'acquisition, cependant lorsque l'on augmente la taille des échantillons le bruit de fond en ELISA s'accroit aussi.

Ce type de test peut-il être utilisé pour mettre en place des études épidémiologiques (détection du virus dans le puceron) ?

La réponse est plutôt négative. En effet on sait qu'un seul puceron après quelques heures d'acquisition peut transmettre le VEPT.

En conséquence le test ELISA tel qu'il est actuellement pratiqué ne peut que donner une estimation de risque très grossière.

Ce type de test permet-il d'établir définitivement la non multiplication du VEPT dans le puceron vecteur ? (TABLEAU 22).

On sait que le test ELISA permet de détecter de l'ordre de 1 à 2 ng de VEPT. Des calculs effectués lors d'essais non rapportés ici montrent que la concentration maximale du virus dans des pucerons ayant séjourné sur la plante source plus de deux semaines, n'est pas supérieure à 2 ng/puceron.

En conséquence une faible multiplication virale ne serait pas détectable surtout si elle est localisée à un tissu de l'hôte. Cependant le fait que la concentration virale soit directement proportionnelle au temps de séjour sur la plante infectée suppose qu'en fait le VEPT est bien circulant plutôt que multipliant.

Des essais plus complets par la méthode immunoenzymatique devraient permettre de préciser par ailleurs la vitesse de libération ou de dégradation du virus dès que le puceron vecteur quitte le végétal réservoir.

CHAPITRE VII

QUELQUES OBSERVATIONS

sur le groupe des

LUTEOVIRUS

Le TABLEAU 23 présente les principales maladies occasionnées par des Luteovirus essentiellement dans les zones tempérées ou méditerranéennes. Tous les virus responsables ont pu être isolés au moins une fois sauf ceux du trèfle souterrain.

L'étude de ces 18 maladies et des virus en cause permet de présenter quelques remarques et suggestions suivantes :

MALADIE		SOUCHE VIRALE	VECTEURS PRINCIPAUX
Jaunisse Nanisante de l'Orge	"Barley yellow Dwarf"	RPV	rhopalosiphum padi
		MAV	Macrosiphum avenae
		PAV	R. padi et M. avenae
		SGV	Schigaphis graminum
		RMV	R. maïdes
Giallume du riz		?	R. padi, ...
Jaunisse phloemique de la betterave	"Beet Western Yellows"		Myzus persicae
	"Beet Mild Yellowing"		"
	"Turnip Yellows"		"
	"Malva yellows"		"
	"Solanum yellows"		"
	"Tobacco Necrotic Dwarf"		"
Enroulement de la pomme de terre	"Potato Leaf Roll"		"
	"Physalis mild chlorosis"		"
	"Physalis vein blotch"		"
Jaunisse d'Eté de la laitue	"Lettuce summer yellows"		"
	"Soybean dwarf"		Acyrthosiphum solani
	"Subterranean clover red leaf"		"
	"Subterranean clover stunt"		Acyrthosiphum craccivora
	"Milk-vetch dwarf"		"
Jaunisse Apicale du pois	"Pea Leaf Roll"		Acyrthosiphum pisi
	"Legume yellows"		"
Feuilles rouges de la carotte	"Carrot red leaf"		Cavariella aegopodii

Principaux luteo virus et leurs vecteurs.

TABLEAU 23

A. SYMPTOMATOLOGIE

La multiplication des Luteovirus dans les tissus phloémiques détermine un blocage des produits de la synthèse chlorophylienne. Les feuilles deviennent épaisses et craquantes, redréssées et prennent une coloration allant du jaune (Orge : VJVO, betterave BWYY) au rouge (blé - VJNO) ou au violet - (pomme de terre VEPT).

Lorsque ces conditions sont favorables ces symptômes sont obtenus au bout de 10 à 20 jours sur les feuilles les plus âgées. Les exigences en lumière (forte intensité) sont celles qui sont les plus marquées pour les luteovirus.

Le temps relativement long nécessaire à l'expression des symptômes est une caractéristique des virus de ce groupe.

Cependant on connait un agent pathogène dont on ne sait pas encore s'il doit être confondu avec le VJNO et qui occasionne en 4 à 5 jours la mosaïque en tirets du maïs (M. MEHRAD - H. LAPIERRE - 1976).

Lors de premiers résultats on avait pu qualifier l'agent pathogène de semi persistant dans son vecteur. Cependant sur les jeunes maïs, les pucerons de l'espèce en cause : R. padi, subsistent difficilement. Si effectivement ce pathogène est une souche particulière du VJNO, deux types de conclusions peuvent être proposées.

1 . Dans la majorité des cas la période de latence dans la plante est longue lors de l'infection par les luteovirus. Cependant ce critère n'est pas absolu.

2 . Dans la majorité des cas les symptômes dus au luteovirus s'expriment sous forme de larges taches plus ou moins diffuses. Dans un cas au moins l'agent pathogène détermine de petits tirets chlorotiques.

LA MOSAIQUE EN TIRET DU MAIS

B. STRUCTURE DE LA NUCLEOCAPSIDE.

Peu d'informations sont encore sur la structure capsidale des luteovirus. Cependant un certain nombre de résultats présentés par différents auteurs permettent de penser à une certaine hétérogénéité pour ce qui est des conditions de conservation de cette structure.

a . Effet des ions ou de leurs chelateurs.

Dans le cas du virus de la jaunisse phloémique de la betterave "beet western yellow", C.J. ARCY et ADIZOETEN (1977) a montré l'importance des ions Mg^{++} dans la stabilisation du virus.

Au contraire on a remarqué que dans le cas du VEPT, les particules étaient parfaitement résistantes à des concentrations d'EDTA de l'ordre de 10^{-2} M. (chapitre II)

Nous avons comparé une purification menée avec ou sans EDTA dans le cas du VJNO (souche PAV). Ce virus est lui aussi très sensible à l'EDTA (GRAPHIQUE 19 - 20 - 21).

b . Effet du lauryl sulfate de sodium (SLS).

La sensibilité de ces virus au SLS donne une bonne indication sur la présence prépondérante ou non de liaisons RNA protéines (chapitre III).

Nous avons observé dans le cas de VJNO (souche PAV) une sensibilité voisine de celle qui a été décrite dans le cas du VEPT (chapitre III).

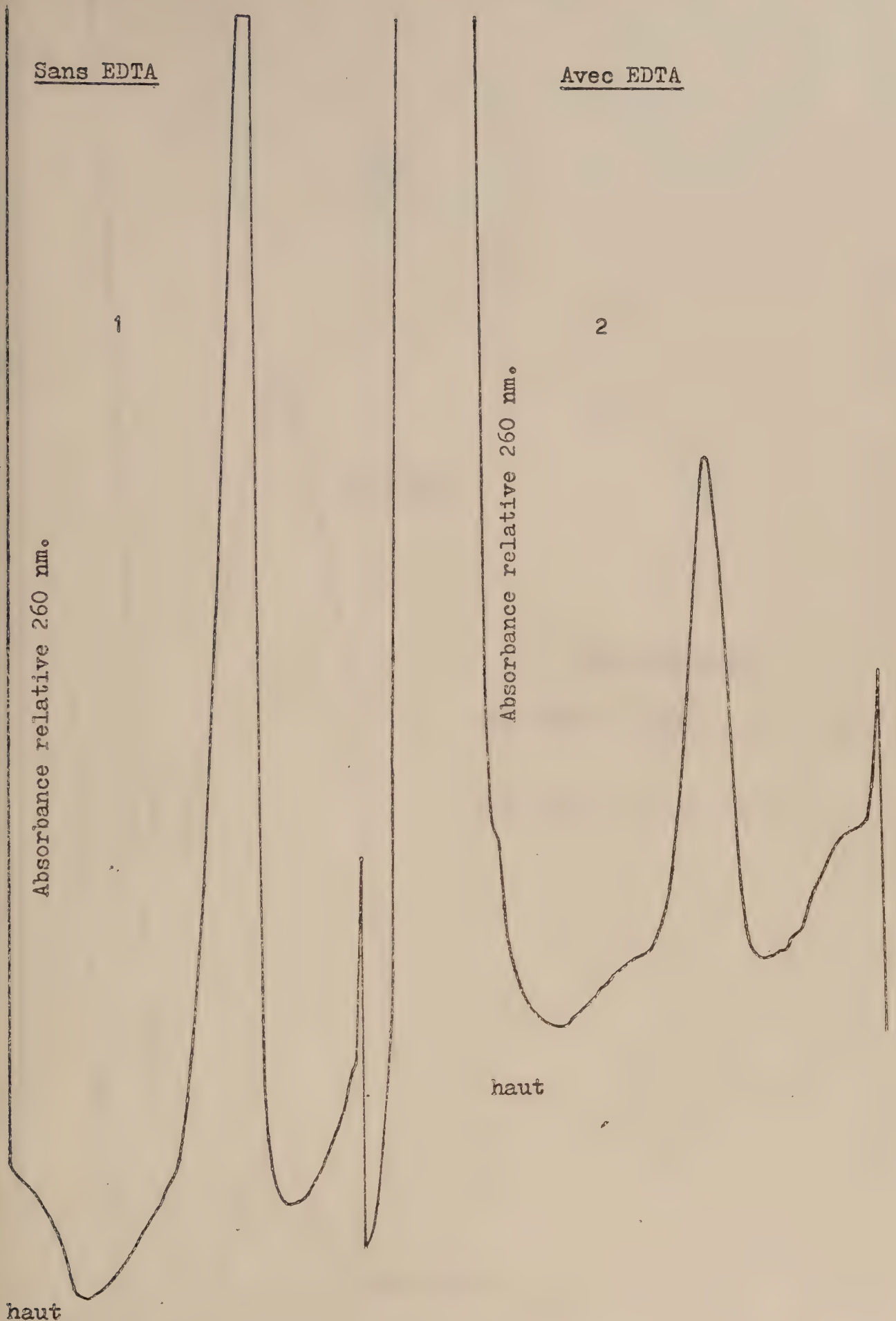
Ce résultat va dans le même sens que le fait que l'on n'observe pas de particules denses.

On peut donc considérer que ce type de liaisons jouent un rôle considérable pour la stabilisation de la nucléoprotéine des Luteovirus.

Cet ensemble de caractère nous amène à proposer un schèma concernant la structure nucléoprotéine des Lutéovirus.

Ce schéma tient compte du fait que probablement tous les Luteovirus possédent dans leur capside qu'un seul type de sous unitéprotéique (SCALA et ROCHOW (1977). On a indiqué l'existence de liaison protéine protéine particulièrement dans le cas du VEPT pour prendre en compte l'existence de rares particules sans acide nucléique mais aussi la sensibilité moyenne de ces virus au SLS.

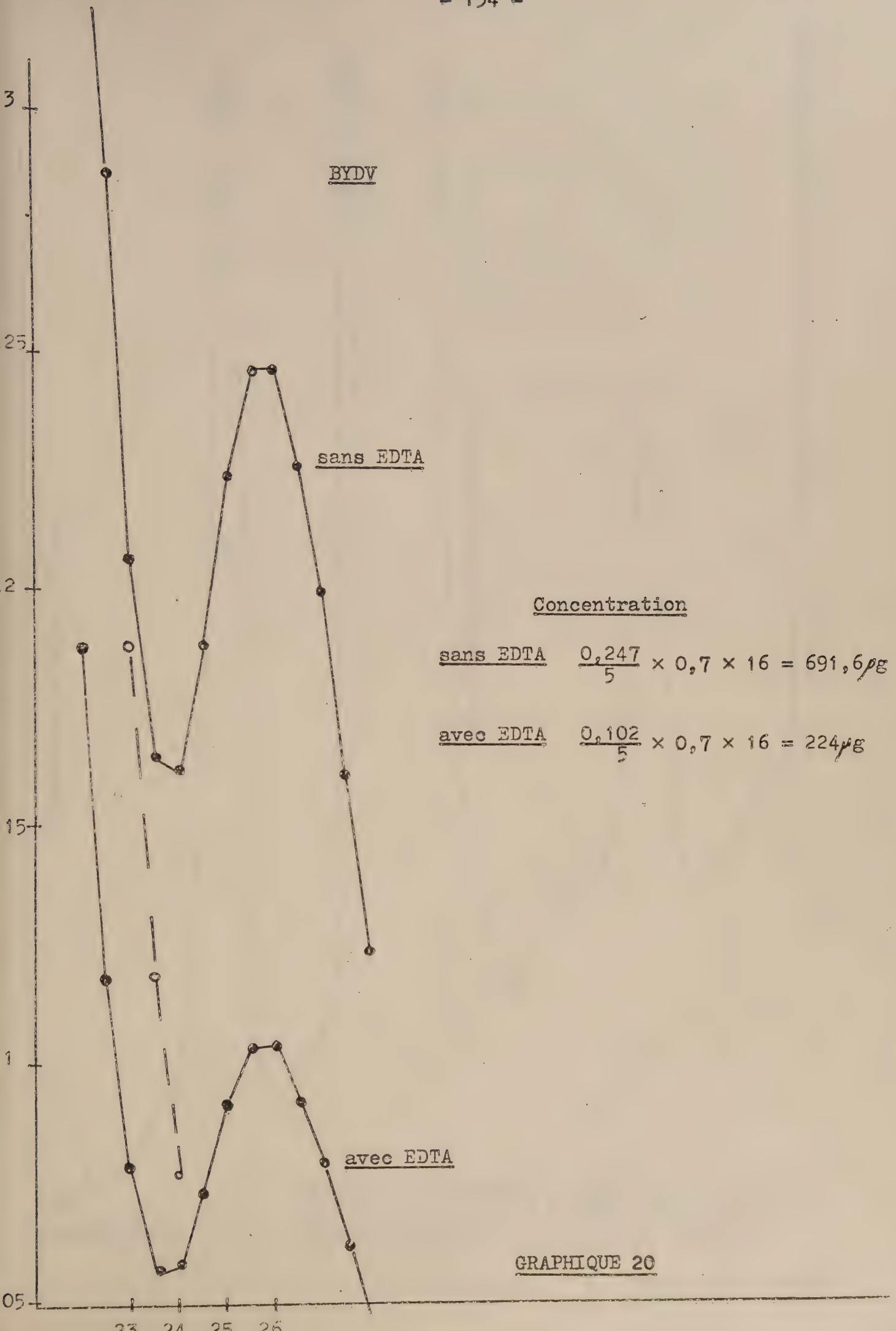
La mise en évidence de particules essentiellement creuses dans le cas du "Beet Mild



GRAPHIQUE 19

Analyse en gradient de saccharose d'extraits partiellement (300 g chaque) purifiés du BYDV
Tampon phosphate M 0,1 pH 7,2, clarifiés 1/2 V/V mélange chloroforme et butanol

1. sans EDTA 2. avec EDTA M = 0,01

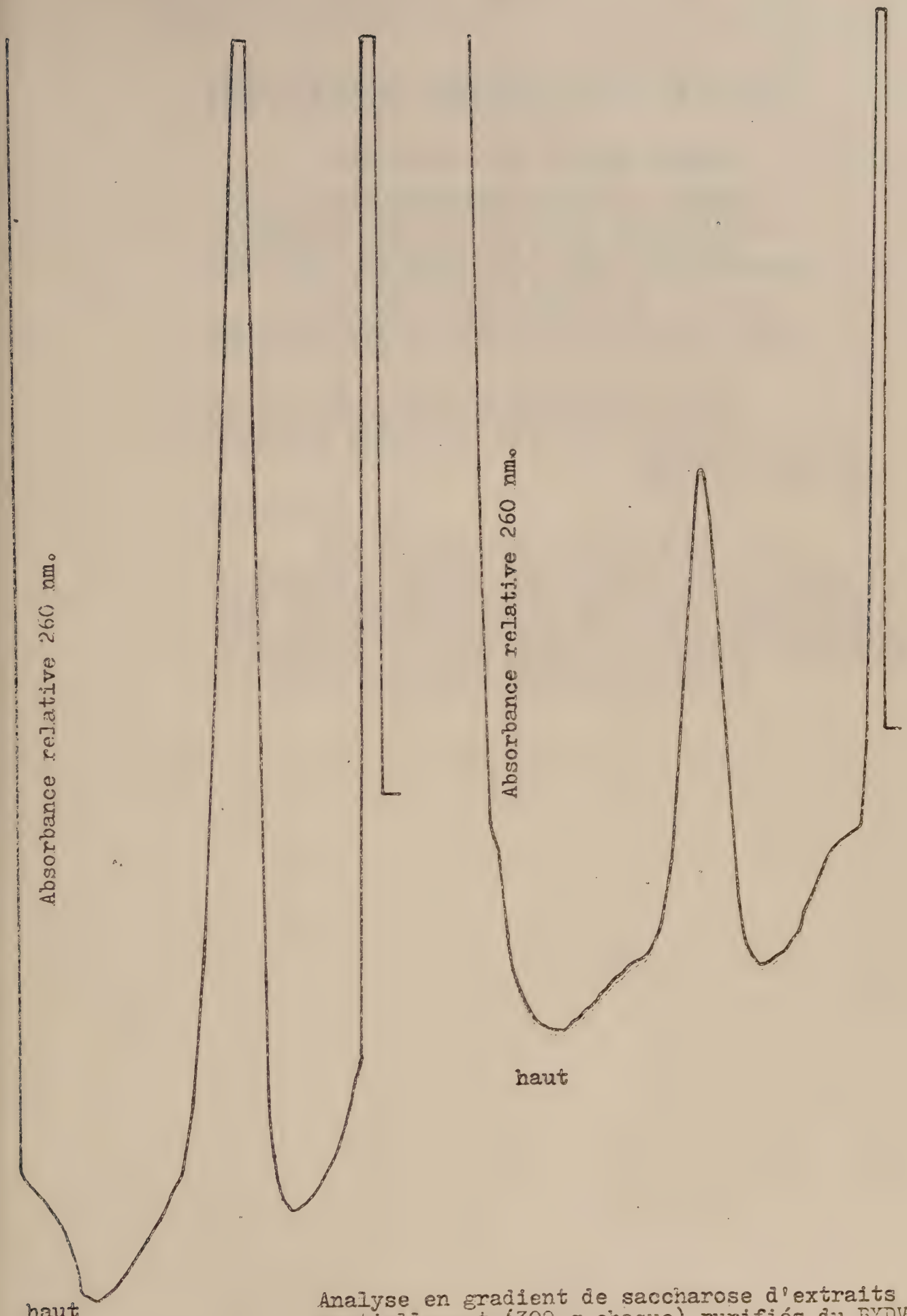


Concentration

sans EDTA $\frac{0,247}{5} \times 0,7 \times 16 = 691,6 \mu g$

avec EDTA $\frac{0,102}{5} \times 0,7 \times 16 = 224 \mu g$

GRAPHIQUE 20



GRAPHIQUE 21

Analyse en gradient de saccharose d'extraits partiellement (300 g chaque) purifiés du BYDV
Tampon phosphate M 0,1 pH 7,2, clarifiés 1/2 V/V mélange chloroforme et butanol

1. sans EDTA 2. avec EDTA M = 0,01

yellowing virus" (HARTLEB et coll. 1977) peut être considérée de deux façon :

soit les auteurs se sont trompés.

Soit comme dans le cas de l'agent pathogène du maïs F7 on est en présence d'une espèce très éloignée des virus types. Ces particules ont dû en effet perdre partiellement les liaisons de type RNA protéines.

Une autre caractèristique importante des lutéovirus tient à la concentration élevée des particules en acide nucléique.

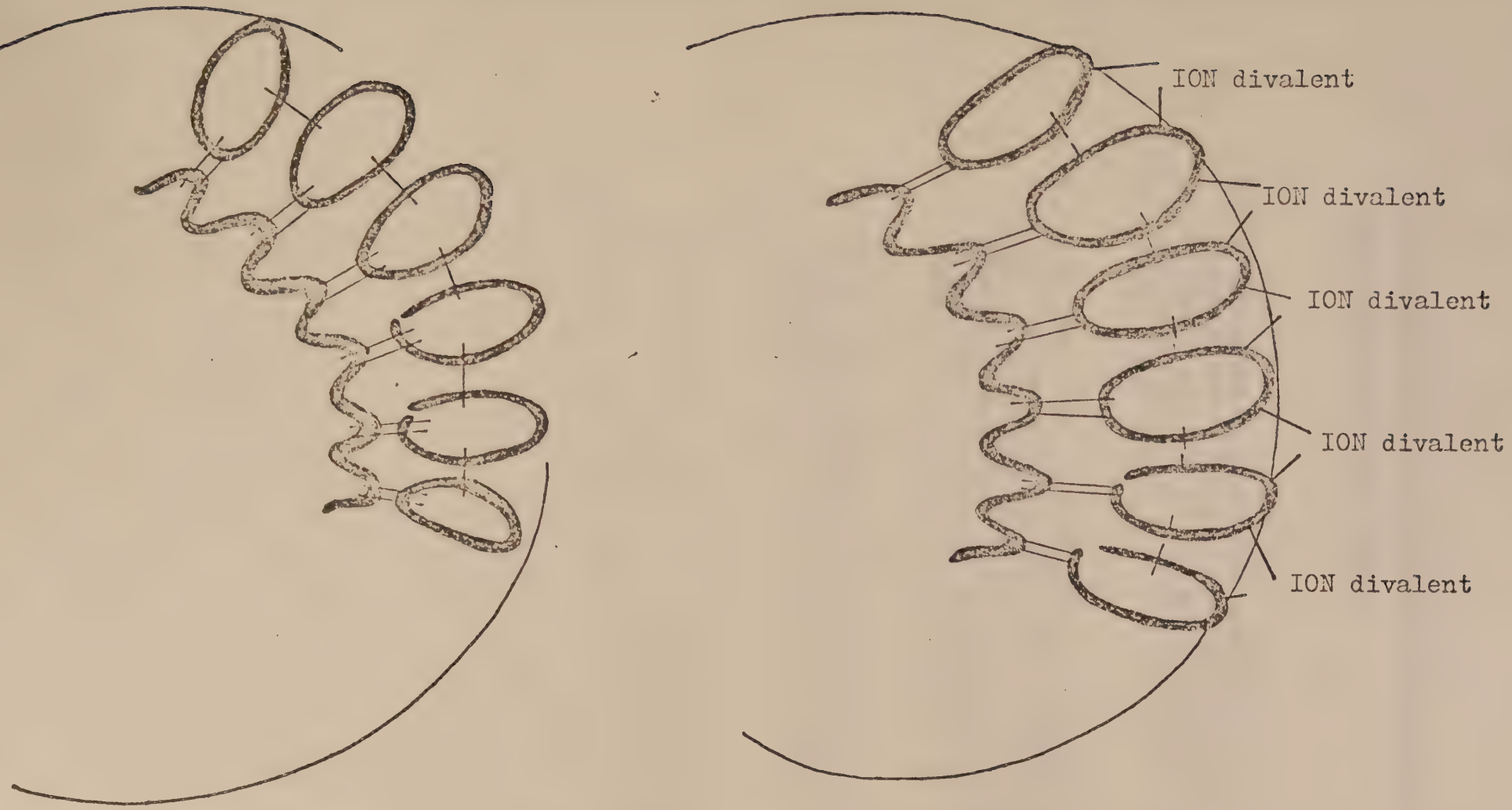
Le tableau 24 indique que seuls les Nepo virus (particules lourdes) et les lutéovirus présentent un rapport $\frac{\text{absorption 2600 A°}}{\text{absorption 2800 A°}}$ supérieur à 1,8.

Ces deux groupes de virus n'ont que peu de points communs. Les conséquances de ce taux élevé en acide nucléique ne rendent pas les particules du types VEPT particulièrement sensibles à RNAse, malgré l'importance des liaisons en RNA protéines (résultats non présentés) - Cette observation renforce l'hypothèse de liaisons protéine-protéine assez fortes.

Absorption relative en U.V. $\frac{2600\ A^\circ}{2800\ A^\circ}$	Virus ou groupe de virus
$< 1,5$	Sowbane Mosaïc Virus
1,5 à 1,6	Southern Bean Mosaïc Virus ILARE Virus
1,6 à 1,7	Tomato Bushy Stunt Virus Oat Blue Dwarf Virus
1,7 à 1,8	Como Virus (composant lourd) Tymo Virus Rayado Fine Virus
$> 1,8$	Nepo Virus (composant lourd) Luteo Virus

Regroupement des virus ou des familles de virus à symètrie cubique en fonction de leur spectre d'absorption en U.V.

TABLEAU 24



- VIRUS DE L'ENROULEMENT DE LA POMME DE TERRE
- "SOYBEAN DWARF VIRUS"

- VIRUS DE LA JAUNISSE NANISANTE DE L'ORGE
- JAUNISSE PHLOEMIQUE DE LA BETTERAVE
"Beet Western Yellows"

REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE DEUX TYPES DE LUTEOVIRUS

SCHEMA 5

C. QUELQUES ETUDES A ENTREPRENDRE POUR MIEUX DEFINIR LE GROUPE DES LUTEO VIRUS.

a. L'information génétique portée par les luteovirus reste encore parfaitement inconnue, pour de nombreux groupes de virus on connait au moins les caractères des extrémités 3' et 5' de l'acide ribonucléique viral.

b. Les causes de la multiplication spécifique des lutéovirus dans les cellules phloémiques restent une inconnue. On sait qu'in vitro des cellules mésophyléennes sont capables de repliquer un lutéovirus. L'étude de ce mécanisme devrait permettre d'entrevoir des méthodes de lutte.

c. De la même façon on ne connait pas les raisons de la capacité pour un puceron vecteur spécifique d'accumuler du virus dans les glandes salivaires annexes (ROCHOW ... 1980).

Ce type d'étude mené en relation avec des histologistes et des biochimistes doit permettre de mieux comprendre les relations virus vecteurs.

L'utilisation du test ELISA peut s'avérer un outil très efficace.

CHAPITRE VIII

CONCLUSION

Le virus de l'Enroulement de la Pomme de terre est connu par les symptômes qu'il occasionne sur la plante aux champs et par les problèmes économiques qu'il pose depuis de nombreuses années, d'innombrables études lui ont été consacrées.

La majorité des autres virus des plantes ont été observés au microscope électronique, leurs propriétés physico-chimiques et sérologiques déterminées ; le virus de l'Enroulement restait une énigme, énigme d'autant plus grave que son impact économique est très important.

Parmi les études effectuées antérieurement sur ce virus, certaines d'entre elles, telle celle de PETERS, se sont révélées exactes, mais elles restaient douteuses en raison de l'extrême faiblesse de la quantité de virus qui avait pu être purifié ; d'autres études se sont montrées complètement erronées telle l'affirmation d'un génome viral à acide désoxyribonucléique.

En fait le virus de l'Enroulement réclamait une nouvelle technologie de purification et d'extraction pour pouvoir être enfin analysé et décrit avec certitude.

Deux hypothèses ont été faites à ce sujet : ou bien le virus en faible quantité se trouvait absorbé sur la masse des protéines normales au cours du broyage ou bien le virus restait inclus dans les fibres libéroligneuses et était éliminé à la première filtration. C'est cette deuxième hypothèse qui s'est révélée exacte.

Mais comme l'on ne disposait d'aucun moyen pour tester la présence du virus il a fallu en quelque sorte réussir la purification en aveugle pour pouvoir obtenir le premier

sérum qui allait permettre de guider et d'améliorer les nouvelles purifications.

La purification à partir des différentes parties de plantes nous a montré que la méthode de précipitation par polyéthylène glycol (6000) à 8 p. 100 est la meilleure technique de purification.

Le tampon phosphate d'extraction à la molarité 0,5 contenant de l'EDTA 10^{-2} M, de pH = 7,2 est meilleur que le même tampon sans EDTA.

Le virus est stable dans les solvants organiques, chloroforme, butanol et "Daifon S_3 " (Cl_3 - C2 - F_3).

Pour clarifier il vaut mieux utiliser un mélange équivolumique de chloroforme et butanol.

On obtient le meilleur rendement par purification du virus à partir des fibres de tiges (après 1re extraction de tiges) avec les deuxième et troisième extractions.

Le virus purifié observé au microscope électronique se présente sous forme d'une particule sphérique de diamètre 24 nm, on n'observe pas de capsides vides.

Il est stable dans les sels de césium et dans l'EDTA, mais très sensible au laurylsulfate de sodium. Ces mêmes résultats ont été vérifiés par le test ELISA et signifient que l'acide nucléique du virus confère la stabilité aux sous unité protéiques et que les liaisons protéines acide nucléique sont prépondérantes. L'ensemble de ces caractère rapprochent le PLRV du groupe des Lutéovirus.

Dans cette étude nous avons trouvé que l'acide nucléique de ce virus est un ARN monocaténaire à simple hélice, correspondant à une molécule homogène de poids moléculaire (1,85 X 10^6 à 2.10^6 daltons).

L'ADN préalablement décrit chez le VEPT devrait correspondre, s'il s'agissait du même virus, à une contamination. Cet acide desoxyribonucléique signalé par SARKAR a du rester associé aux virions lors de la purification du VEPT.

Le VEPT contient un ARN de poids moléculaire proche de celui du BYDV et du BWYV (2.10^6 daltons).

C'est un argument supplémentaire pour classer le VEPT dans le groupe des Lutéovirus.

Dans la présente étude nous avons obtenu un antisérum du VEPT en "ring test", une légère réaction avec le BYDV suggère la possibilité de relations sérologiques entre le VEPT et le BYDV.

L'étude du virus de l'Enroulement de la Pomme de terre dans son vecteur Myzus persicae par le test ELISA, a montré que la concentration en virus est d'autant plus grande que les pucerons sont restés plus longtemps sur les pommes de terre enroulées.

De plus nous avons estimé la quantité de virus à 2 ng par puceron après 5 jours d'acquisition.

Après la période d'acquisition, la quantité de virus dans le vecteur diminue, durant le séjour des pucerons sur une plante immune (Chou Chinois), ce résultat suppose que le VEPT ne se multiplie pas dans son vecteur, contrairement aux conclusions de STEGWEE et PONSEN (1958).

Les caractères physicochimiques du VEPT : type et taille de son acide nucléique, sa non multiplication dans son vecteur, permettent de le classer dans le groupe des Lutéovirus.

L'observation en microscopie électronique des coupes ultra fines, a montré une accumulation massive des particules du VEPT d'une dimension uniforme dans les cellules du phloème.

Par purification et par le test ELISA, les résultats ont montré que le virus est localisé et plus concentré dans les vaisseaux ou encore "les tissus fibrovasculaires".des plantes.

Au contraire dans le mésophylle et l'épiderme des feuilles la concentration en particules est très faible si la concentration de virus dans les tiges est particulièrement importante, on trouve aussi une grande quantité de virus dans les racines. Dans les germes des tubercules la quantité de virus détectée est d'autant plus grande que les germes sont développés. Cependant la présence d'inhibiteurs dans les germes jeunes n'a pas été envisagée.

D'après l'étude de CASPER (1977) sur Physalis floridana, la quantité de virus obtenue à partir de racines est très importante, supérieure à celle que l'on trouve dans les feuilles, contrairement à ce qu'à affirmé SARKAR (1976).

Le résultat du test ELISA dans l'étude quantitative de la concentration du virus dans les différents tissus permettra le diagnostic de cette maladie et rend possible dans un proche avenir de réussir la sélection des plantes pour obtenir une meilleure qualité du plant de Pomme de terre.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ARAI K. Y., DOI K., YORA and ASUYAMA 1969 - Electron microscopy of the potato leaf roll virus in leaves of three kinds of host plants and the partial purification of the virus. Ann. Phytopath. Soc. Jpn. 35 : 10-15.

BAWDEN F.C., 1964 - Plant viruses and virus diseases, 4th ed. Ronald Press Compagny, New York, 361 p.

BEEMSTER A.B.R., 1961 - Translocation of leaf roll and virus Y in the potato. Proc. 4th Conf. Potato Virus Dis., Braunschweig 1960, p. 60-67.

BEEMSTER A.B.R., and ROZENDAAL A.L., 1972 - Potato viruses : properties and symptoms in viruses of Potato and seed potato. Production de BOKX, J.A. (ed). Wageningen P.P. 115-142.

BEEMSTER A.B.R. and DIJKSTRA J. (eds.) 1966 - Viruses of plants. Amsterdam : North-Holland.

BERNAL J.D., and FANKUCHEN 1941 - X - RAY and crystallographic studies of plant virus preparations. III J. Gen. Physiol. 25 : 147-165.

BOEDTKER H. 1968 - Dependence of the sedimentation coefficient on molecular weight of RNA after reaction with formaldehyde. J. Mol. Biol. 35 : 61-70.

BOTJES OORTWIJN J.G. 1920 - Debladrolziekte van de aardappelplant, 8 : 1-136. H. Veenman en Zonen, Wageningen.

BRAKKE M.K., and ROCHOW W.F. 1974 - Ribonucleic acid of Barley Yellow Dwarf Virus. Virology 61 : 240-248.

BRANDENBURG E.

1962 - Untersuchungen über das Blattrollvirus der Kartoffel. I. Mechanisce Uebertragung und chemischer. Phytopathol. Z 43 : 420-404.

BRENNER S., and HORNE R.W.

1959 - A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses.
Biochim. Biophys. Acta 34 : 103-110.

CASPER R.

1977 - Detection of potato leafroll virus in potato and in Physalis floridana by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).
Phytopath. Z. 90 : 364-368.

CLARK et ADAMS

1976 - The detection of plum pox and other viruses in woody plants by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).
Acta horticultural. 67 : 51 - 57.

CLARK et ADAMS

1977 - Characteristics of the microplate of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plants viruses.
J. Gen. Virol. 34 : 475-483.

COUSIN M.T.

1975 - l'Enroulement violacé de la Pomme de terre.
Ann. Phytopathol. 7 - (2) : 167-173.

DANNA Kathleen J. - SACK H. George, Jr and NATHANS Daniel - 1973 - Studies of Simian Virus 40 DNA - a cleavage Map of the SV 40 genome.
J. Mol. Biol. 78 : 363-376.

D'ARCY C.J.

1978 - Studies on Beet Western Yellows Virus.
Ph. D. Thesis.
Wisconsin Madison 100 pp.

DAY M.F., and ZAITLIN M.,

1959 - Infectivity and electron microscopy extracts of Physalis floridana plants infected with potato leaf roll virus.
Phytopathol. Z. 34 : 83-85.

DERRICK K.S. — 1973 - Quantitative assay for plant viruses using serologically specific electron microscopy. Virology 56 : 652-653.

DeZOETEN G.A. and GAARD, — 1969 - Possibilities for inter and intracellular translocation of some icosahedral plant viruses. J. Cell. Biol. 40 : 814-823.

DUFFUS J.E. — 1969 - Membrane feeding used in determining the properties of beet western yellows virus. Phytopathology 59 : 1668-1669.

DUFFUS J.E. and GOLD A.H. — 1969 - Membrane feeding and infectivity neutralization used in a serological comparison of potato leafroll and beet western yellows viruses. Virology 37 : 150-153.

DUFFUS J.F. and RUSSEL G.E. — 1970 - Serological and host range evidence for the occurence of beet western yellows virus in Europe. Phytopathology 60 : 1199-1202.

DUFFUS J.E. and RUSSEL G.E. — 1972 - Serological relationship between beet western yellows and turnip yellows viruses. Phythopathology 62 : 1274-1277.

DUFFUS J.E. and ROCHOW W.F. — 1973 - Positive infectivity neutralization reactions between isolates of beet western yellows virus and antisera againts Barley Dwarf Virus . Abstract. N° 0695 in Abstracts of Papers 2nd Int. Cong. Plant. Pathol., 5-12 sept. 1973 Mineapolis Minnesota (Unpaged).

DUFFUS J.E. and RUSSELL. G.E. — 1975 - Serological relationship between beet western yellows and beet Mild yellowing viruses. Phytopathol. 65 : 811-815.

DUFFUS J.E. 1977 - Serological relationships among beet western yellows Barley Yellow Dwarf, and Soybean dwarf viruses. Phytopathology 67 : 1197-1201.

DUFFUS J.E. and MILBRATH G.M. 1977 - Suceptibility and immunity in Soybean to beet western yellows virus. Phytopathology 67 : 269-272.

DUFFUS J.E. 1978 - Serological relationship between Beet Western Yellows Virus and pea leaf roll Virus. Abstract n° 21 août 1978.

ENGVALL EVA, JONSSON K., PERLMANN P. 1971 - Enzyme linked immunosorbent Assay II, Quantitative Assay of protein Antigen Immunoglobuline, by Means of Enzyme - Labelled antigen an antibody-coated tubes. Biochim. Biophys. Acta 427-434.

ENGVALL EVA, PERLMANN P. 1972 - Enzyme-linked immunosorbent assay "ELISA". III Quantitation of specific Antibodies by Enzymelabelled Anti-Immunoglobulin Antigen-coated Tubes. I. Immunol. 109 (1) 129-135.

EPSTEIN H.T. 1953 - Identification of Radiosensitive volume with Nucleic Acid Volume. Nature - Vol. 171 : 394-395.

(360) FALK B.W., DUFFUS J.E. and MORRIS T.J. 1977 - Two RNA species Isolated from purified beet western yellows virus department of plant pathology. University of california Berkeley 94720, and ars USDA, U.S. Agriculture Research station, salinasca 93901. soc. 4, 160 (abstr. 360).

FELDMANN G., DRUET P., BOGNON J., AVRAMEAS S., 1976 - Immunoenzymatic techniques In proceedings of the first International symposium on immunoen-symatic techniques. P. 512. Amsterdam : North-Holland publishing Co.

FENNER F.

1976 - Classification and Nomenclature of Viruses.
Intervirology Vol. 9 : 1-115.

FRAENKEL-CONRAT H.

1956 - Hydrolysis of nigerose by intestinal extracts.
J. Am. Chem. Soc. 78 : 882-883.

FRAENKEL-CONRAT H.

1956 - The role of the Nucleic Acid in the reconstitution of Active Tobacco Mosaic Virus.
Ameri. Chem. Soc. Vol. 78 : 882-883.

FRANCKI R.I.B., and HABILI N.

1972 - Stabilization of capsid structure and enhancement of immunogenicity of cucumber mosaic virus (Q strain) by formaldehyde.
Virology 48 : 309-315.

FRAVAL A. et LAPIERRE H.

1970 - Isolement à partir de graminée de pucerons (Homoptera Aphididae) d'un virus à RNA.
Acad. sc. Paris, T 270, P. 890-893.

GIBBS A.J.

1969 - Plant virus classification adv. in virus.
Res. 14 : 263-328.

GIERER A.G., SCHRAM

1956 - Infectivity of Ribonucleic Acid from tobacco Mosaic Virus.
Nature 177 : 702-703.

GILL C.G., CHONG J.

1975 - Development of the Infection in Oat leaves inoculated with Barley Yellow Dwarf Virus.
Virology 66 : 440-453.

GOLD A.H. and DUFFUS J.E.

1967 - Infectivity neutralization a serological method as applied to persistant viruses of beets.
Virology 31 : 308-313.

GOLINOSKI W.,

1978 - Cytological investigation of potato phloem infected by leaf roll virus Zerz. probl. postep. parazonego
Wirusom nº 2140 : 199-206.

GRYLLS N.E., and BUTTLER P.C. 1959 - Subterranean clover stunt, a virus disease of pasture legumes Austral.
J. agric. Res. 10 : 145-159.

GUGERLI P.L. 1978 - The detection of two potato viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).
Phytopath. Z. 92 : 51-56.

GUGERLI P.L. 1979a - Potato virus A and potato virus, purification, antiserum production and serological detection in potato and test plants by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
Phytopath. Z. 96 : 97-107.

HALL E. Cecil 1955 - Electron Densitometry of stained virus particules.
J. Biophys. Biochem. Cythol. Vol I n° 1 page 1-12 (plates 1 and 2).

Hall E. Cecil 1964 - Electron microscopy principles and application to virus research.
in : M.K. CORBETT & H.D. SISLE (eds), plant virology Univ. Pla. Press.

HARPER F.R., NELSON G.A., PITT MAN U.J. 1975 - Relationship between leaf roll symptoms and vield in netted gem. potato.
Phytopathology 65 (II) 1242-1244.
(Res. Sta. Agri. Can. Lethbridge, Alta. Canada TI J 4 BI.

HARRISON B.D. 1958 - Studies of the behaviour of PLRV and others viruses in the body of their Aphid Vector Myzus persicae SULZ.
Virology 6 : 265-277.

HARTLEB H., OPEL H., SCHMIDT H.B., PROLL E., MILLEER 1977 - Isoleiesing und electronen mi krosdopises darstelling des vins der milden rübenuirgilbing.
Arch. Phytopathol. u. pflanzenchulz, Berlin 12 (1973) 5.

HEBERT T.T. 1963 - Precipitation of plant viruses by polyethylene glycol. Phytopathol. 53 362.

HEINZE K. 1955 - Versuche zur Ubertragung des blattroll virus der Kartoffel in den Uberträger (Myzaides percicae sulz) mit injektions verfahren. Phytopath. Z 25 : 103-108.

HEPP R.F. De ZOETEN G.A. 1978 - Purification of potato leafroll virus and an evaluation of methods for its diagnosis. Amer. Potato J. 55 : 125-139.

HULL R. 1976 - The behavior of salt labele plant virus in gradients of cesium sulfate. Virology 75 : 18-25 (1976).

JENSEN S.G. 1969 - Occurence of virus particules in the phloem of Barley Yellow Dwarf Virus infected Barley. Virology 38 : 83-91.

JOHNSON J. 1951 - Virus particules in various plant species and tissues. Phytopathology 41 : 78 - 93.

KAPER J.M. WATERWORTH H.E. 1973 - Comparaison of molecular weights of single stranded viral RNAs by two empirical methods. Virology 51 (1) 183-190.

KAUSCHE G.A., PFANKUCH u. RUSKA H. 1939 - Die Sichtnarmachung von pflanzlichem Virus im Ubermikroskop. Naturwissenschaften 27 : 292-299.

KEITH R., YAMAMOTO and BRUCE M. ALBERTS, Rolf BENZINGER, LARRY LAWHORNE 1970 - Rapid Bacteriophage Sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its Application to large scale virus purification. Virology 40 : 734-744.

KIRKPATRICK H.C. 1948 - Indicator plants for studies with the leafroll virus of potatoes. Am. Potato J. 25 : 283-290.

KITANO T. HARUNA I. WATANABE I. 1961 - Purification and concentration of viruses by an arganic solvant system. Virology 15 : 503-501.

KOJIMA M. 1974 - Studies on potato leaf roll virus J Fac Agric Hokkaido Univ 57 : 368-438.

KOJIMA M., SHIKATA M., SUGAWARA and MURAYAMA 1968 - Isolation and electron microscopy of potato leaf roll virus from plants. Virology 35 : 612-615.

KOJIMA M., SHIKATA E., SUGAWARA M., and MURAYAMA D. 1969 - Purification and electron microscopy of potato leaf roll virus. Virology 39 : 162-174.

KOJIMA M., and MURAYAMA 1972a - An attempt to prepare antiserum against potato leaf roll virus. Ann. Phytopathol Soc Jpn 38 : 255-257.

KOJIMA M., and MURAYAMA 1972b - The application of polyethylene glycol precipitation for purification of potato leaf roll virus. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn 38 : 431-433.

KOJIMA M., and TAMADA 1976 - Purification and serology of soybean dwarf virus. Phytopathol. Z. 85 : 237-250.

KOJIMA M., CHOU T.G., SHIKATA E., 1978 - Rapid diagnosis of potato leaf-roll virus by immune Electron Microscopy. Phytopathology 44 : 585-590.

LISTER R.M., and ROCHOW W.F. 1978 - Detection of Barley Yellow Dwarf virus isolates in ELISA tests. Abstr. 207 Phytopath. News 12, 172.

LISTER R.M., and ROCHOW W.F., 1979 - Detection of Barley Yellow Dwarf Virus by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).
Phytopathology 69, in press.

LOENING U.E. 1969 - The determination of the molecular weight of ribonucleic acid by acrylamide gel electrophoresis. The effects of change in conformation.
Biochemical Journal 113 : 131-138.

LOT H., KAPER J.M., 1973 - Short communication comparison of the buoynat Density Heterogeneity of cucumber Mosaic virus and Brome Mosaic virus.
Virology 54:540

MAAT D.Z., BOKX J.A. DE, 1978 - Potato leafroll virus : antiserum preparation and detection in potato leaves and sprouts with the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).
Netherlands journal of plant pathology 84 : (4) 149-156.

MACKINNON J.P. 1965 - A mild chlorosis virus of Physalis floridana found in a turnip latent virus. complex.
Can. J. Botany 43 : 509-517.

MACKINNON J.P. 1967 - Greenhouse evaluation of potato seedlings for leaf roll virus resistance
Am. Potato J. 44 : 309-315.

MACKINNON J.P. 1969 - High levels of resistance to potato virus found in greenhouse tests.
Am. Potato J. 46 : 54-56.

MACKINNON J.P. 1972 - Variation in aphid transmission of leaf roll virus to and from potato.
Can. J. Bot. 50 : 23-27.

MANZER F.E., STORCH R.H. and MERRIAM D.C. 1977 - Testing for mild leafroll
Am. Potato J. 54 : 97-101.

McSHARRY J., BENZINGER R. 1970 - Concentration and purification of Vesicular Stomatitis Virus by Polyethylene glycol "Precipitation".
Virology 40 : 745-746.

MARAMOROSCH Karl 1952 - Direct evidence for the multiplication of aster - yellows virus in its insect Vector.
Phytopathology 42 : 59-64.

MASAYOCHI, SUGAWARA, MAKOTO, KOJIMA and DAIKI, MURAYAMA - 1974 - Latent period and retention of potato leafroll virus in its vectors, Myzus persicae.
Ann. Phytopath. Soc. Japan 40 : 39-45.

MATSUURA Y. 1953 - Studies on the dwarf disease of milk-vetch (Astragalus sinicus) Ann.
Phytopath. Soc. Japan 17 : 65-68.

MEHRAD M. et LAPIERRE H. 1976 - La mosaïque en tirets du Maïs une nouvelle maladie a virus ? Ann. Phytopathol. Vol. 9 n° 4.

MEHRAD et LAPIERRE H. 1977 - Purification et propriétés du virus de l'Enroulement de la Pomme de Terre. Ann. Phytopathol. 9 (1) 83-99.

MEHRAD M. et LAPIERRE H., MAURY 1978 - Le Virus de l'Enroulement de la Pomme de terre - Purification, détection sérologique et dosage dans la plante. C.R. Acad. Sciences PARIS, SER D, 280, 1179-1182.

MEHRAD M. LAPIERRE H. and YOT 1979 - RNA in potato leafroll virus. FEBS letters volume 101, number 1.

MURAYAMA D. KOJIMA M. 1965 - studies on the properties of PLRV by aphid Injection Method. Ann. Phytopathology Soc. Jpn 30, 209-215

MURAYAMA D. KOJIMA M. 1973 - Studies on potato leaf-roll in JAPAN. Rept. Tottori Mycol. Inst. Japan, 10.

MURAYAMA D. KOJIMA and TAMADA 1973 - Purification and serology of two aphid-borne circulative viruses. Second Int. Congr. Plant path. Univ. of Minnesota Mineapolis. Abstr. of papers abst. # 0092

MURAYAMA, D., KOJIMA, M., and TAMADA 1974 - The serological relationship between potato leaf roll virus and soybean mosaic virus. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn 40 : 212 (Abstr. in Japanese).

MURAYAMA, D. and KOJIMA M. 1974 - Antigenicity of potato leafroll virus. Proc. Japan. Acad. 50, 322-327.

PALIWAL Y.C. 1978 - Purification and some properties of Barley Yellow Dwarf Virus. Phytopathol. Zeitschrift 92 (3) 240-246 (Em, de 13, ref. 2 fig.) Chem. Biol. Res. Inst. Agric. Canada, Ottawa ont. Canada.

PALIWAL and SINHA R.C. 1970 - On the Mechanism of persistence and distribution of Barley Yellow Dwarf virus in an Aphid Vector. Virology 42, 668-680.

PALIWAL, Y.C. 1977 - Rapid diagnosis of Barley Yellow Dwarf Virus in plants using serologicall specific electron microscopy. Phytopath. Z 89, 25-36.

PAUL H.L. Von 1959 - Die Bestimmung des Nucleisäuregehaltes pflanzlicher Viren mit Hilfe einer spektrophotometrischen Methode. Z. Naturforschg. 14b, 427-432 (am 9).

PETERS, D., 1967 - The purification of potato leafroll virus from it vector Myzus persicae. Virology 31, 46-54 et thèse.

PHILLIP A., SHARP, BILL Sugden, and Joe SAMBROOK, 1973 - Detection of Two Restriction Endonuclease Activities in Haemophilus Parainfluenzae using Analytical Agarose - Ethidium Bromide Electrophoresis. Biochemistry Vol. 12, n° 16 :3055

PHILIPSON L. 1967 - In "Methods in virology" (K. MARAMOROSCH. and H. KOPROWSKI, ed). Vol. II : 235-244. Academic Press, New York.

PINCK M, YOT P. CHAPEVILLE F. DURANTON H.N. 1970 - Enzymatic binding of valine to the 3' end of TYMV RNA. Nature 226, 954-956.

PINCK L. and FAUQUET C. 1975 - Analysis of the Pancreatic-Ribonuclease-Digestion products of "Alfalfa-Mosaic Virus" Ribonucleic acid. Eur. J. Biochem. 57. 441-451.

PONSEN M.B. 1969 - "The effect of potato leafroll virus on the biology of Myzus persicae". Plant. Pathol. Neth. J. 75, 360-368.

PONSEN M.B. 1970 - "The Biological Transmission of Potato leafroll Virus by Myzus persicae" Plant. Pathol. Neth. J. 76, 234-239.

POTATO DISEASES Agriculture handbook n° 474 United states département of agricultural research service. n° 474, page 49-50. Leafroll.

PRICE R.D. MULLER IRMGARD, ROCHOW W.F. 1971 - "Variation in Transmission of an Isolate of Barley Yellow Dwarf by Rhopalosiphum padi". Phytopathology, 67 753-754.

QUANJER H.M. LEK H.A.A. VANDER and OORTWIJN BOTJES (1916) Aard, verspreidingswijze en lustrijding van Phloemnecrose (bladrol) en vervante ziekten. O. a. Serch. Meded. Landbouwhogeschool 10, 1-138.

QUANTZ L. und J. VOLK 1954 - Die Blattrollkrankheit der Ackerbohne und Erbse, eine neue viruskrankeit bei leguminosen. Nachrichtenbl. Dtsch. Pflanzenschutzd. (Braunschweig) 6, 177-182.

REBACCA A. JOHNSON and ROCHOW W.F. 1972 - An isolate of Barley Yellow Dwarf virus transmitted specifically by Schizaphis graminum. Phytopathology 62, 921-925.

RENATE KOENIG, R.Y. 1978 - "ELISA in the study of homologous and Hterlogous reactions of plant viruses J. Gen. Virol. 40 309-318.

RICHARDSON D.E. 1967 - "Diagnosis of potato leafroll virus in Postharvest Glass house Tests" Plant. Pathol. 25, 141-143.

ROWHANI, A. STACE-SMITH, R. 1979 - Purification and characterisation of potato leaf roll virus virology 98 : 45-54.

ROCHOW W.F. 1958 - "The role of Aphids in Vector specificity of Barley Yellow Dwarf Virus

ROCHOW W.F.

1960 - Transmission of BYDV acquired from liquid extract by aphids feeding Trough Membranes.
Virology 12, 223-232.

ROCHOW W.F.

1963 - "Latent periods in the aphid Transmission of Barley Yellow Dwarf Virus".
Photopathology, 53, 355-356.

ROCHOW W.F. BRAKKE M.K.

1964 - "Purification of Barley Yellow Dwarf Virus".
Virology 24, 310-322.

ROCHOW W.F.

1969 - "Biological properties, of four isolates of Barley Yellow Dwarf.
Phytopathology, 59 (11), 1580-1589.

ROCHOW W.F. AAPOLA A.E.I.

BRAKKE M.K. CARMICHAEL L.E. 1971 - Purification and antigenicity of three isolates of Barley Yellow Dwarf Virus.
Virology, 46, 117-126.

ROCHOW W.F. and MULLER

1975 - Use of Aphids injected with virus - specific antiserum for study of plant viruses that circulate in vectors.
Virology 63, 282-286.

ROCHOW W.F.

1975 - BYDV : Dependent virus transmission by Rhopalosiphum maidis from mixed infection.
Phytopathology, 65 (2) 99-105.

ROCHOW W.F.

1959 - Transmission of strains of Barley Yellow Dwarf Virus by two aphid species.
Phytopathology 49, 749-748.

ROCHOW W.F.

1972 - The role of mixed infection in the transmission of plant viruses by aphids.
Annu. Rev. Phytopathol. 10 : 101-124.

ROCHOW, W.F.

1977 - Dependent virus transmission from mixed infections. Chapter 10. Pages 253-273 in K.F. HARRIS and K. MARAMOROSCH. eds. Aphids as virus vectors. Academic Press. New York 559 p.

ROCHOW, W.F.

1979 - Variants of Barley Yellow Dwarf Virus in nature : Detection and fluctuation during twenty years. Phytopathology 69, in press.

ROCHOW W.F. and J.E. DUFFUS

1973 - Specificity in reactions between isolates of barley yellow dwarf virus and antisera for isolates of beet western yellows virus. Abstract nº 0896 in Abstracts of papers 2nd Int. Congr. plant pathol. 5-12 sept 1973, Minneapolis.

ROCHOW W.F. and H.W. ISRAEL

1976 - Luteovirus group (Barley Yellow dwarf virus) in K. Maramorosch and A.J. Dalton, eds. Insect and plant viruses : Am. atlas Academic Press New York (in Press).

ROCHOW W.F. and DUFFUS E.J.

1978 - Relationships between Barley Dwarf and Beet western Yellows Viruses. Phytopathology Vol. 68 : 51-58.

ROCHOW W.F. and DUFFUS J.E.

1977 - Relationships between Barley Yellow Dwarf and beet western yellows viruses. Phytopathology 67 : 51-58.

ROCHOW W.F., CARMICHAEL, L.E.

1979 - Specificity among barley yellow dwarf viruses in enzyme immunosorbent assay. Virology 95 (2) 415-420.

ROCHOW W.F.

1969a - In "viruses, vectors and vegetation (K. MARAMOROSCH, ed.) pp 175-178 Wiley (Interscience) New York.

SALAMAN R.N.

1949 - Some notes of the history of curl. Tijdschr. Plziekt 55, 118-128.

SALAZAR L.F. HARRISON B.D. 1977 - "Two previously indescribed potato viruses from South America". Nature 265: 337-338.

SARKAR S. 1963 - Is the potato leafroll virus transmissible by use of a phenol. extract. Virology 21 : 510-513.

SARKAR, S. and REDDY, D.V.R. 1978 - 3rd Int. Cong. Plant Pathology, Abstract. P 25.

SARKAR S. and BLESSING J. 1973 - DNA-Like properties of the nucleic acid of potato leaf roll virus. Naturwissenschaften 60, 480-481.

SARKAR S. 1975 - A rapid diagnosis by electron microscopy of potato leaf roll virus Potato Res. 18, 227-236.

SARKAR S. 1976 - Potato leafroll virus contains a double strained DNA. VIROLOGY 70, 265-273.

SARKAR, S. 1978 - Characterization of four isolates of the potato leafroll virus. Abstr. 3rd Int. Congr. Plant Pathol. 54.

SCALLA R.ROCHOW W.F. 1977 - Protein component of two isolates of Barley Yellow Dwarf Viruses. Virology 78 : 576-580.

SCHULTZ E.S. and FOLSOM D. 1921 - Leafroll net necrosis and spindling sprout of the Irish potato. Jour. Agr. Res. (U.S.) 21, 47-80.

SEHGAL, O.P. JEAN, J., BHALLA, R.B., SOONG, M.M., and KRAUSE, G.F. 1970 - Correlation between buoyant density and ribonucleic acid content in viruses. Phytopathology 60, 1778-1784.

SHARP A. Phillip, SUGDEN Bill, and SANBROOK Joe 1973 - Detection of two Restriction Endonuclease activities Haemophilus parainfluenzae , Using Analutical Agarose - Ethidium Bromide Electrophoresis.
Biochemistry. vol. 12 nº 16 : 3055-306

SHATKIN, A.J. 1969 - Colorimetric reactions for DNA, RNA, and protein determinations. In "Fondamental Techniques in Virology", (K. Habel and N.P. Salzman, eds.), pp. 231-237. Academic Press, New York.

SHEPHERD R.J., FRANCKI R.R.B., HIRTH L., HOLLINGS M., INOUYE T., MACLEO R., PURCIFULL D.E., SINHA R.C. TREMAINE J.H., VALENTA V., and WETTER C. 1976 - New groups of plant viruses approved by the international comittee on taxonomy of viruses, September 1975. Intervirology 6, 181-184.

SHEPHERD R.J., WAKEMAN R.J., ROMANKO R.R., 1968 - DNA in cauliflower Mosaic virus.
Virology Vol. 36 : 150-152.

SHEPHERD G.E., BRUENING, and WAKEMAN R.J. 1970 - Double stranded DNA From Cauliflower Mosaic Virus.
Virology 41 : 339-347.

SHEPARD J.F. 1972 - Gel-diffusion methods for the serological detection of potato viruses X, S, and M. Montana Agric. Exp. stn Bull 662.

SMITH H.C. 1961 - Barley Yellow Dwarf virus survey in Canada.
Can. Plant diseas survey 41, 344-352.

SMITH P.R. 1966 - A desease of french bean (Phaseolus vulgaris L) caused by subterranean clover stunt virus.
Austral. J. agric. Res 17 : 875-883.

SPRAU 1952 - Elektronenoptische Darstellung des Blattrol virus der kartoffel mit einem Kuzem Ueberkick über die Elektronen-mikroskopie in der virus forschung Z. Pflbau 3 : 213-221.

STANLEY W.M., JUN & BOCK R.M. 1965 - Isolation and physical properties of the ribosomal ribonucleic acid of Escherichia coli.
Biochemistry 4 : 1302-1311.

STANLEY W.M. 1940 - Purification of tomato bushy stun virus by differential centrifugation.
J. Biol. Chem. 135 : 437-454.

STANLEY W.M. 1935b - Isolation of a crystaline Protei possessing the properties of tobacco mosaic virus.
Science 81 : 644-645.

STANLEY W.M. and R.W.G. WYCKOFF 1937 - The isolation of tobacco rigspot and other virus proteines by ultracentri fugation.
Science 85 : 181-183.

STANLEY W.M. 1936 - The inactivation of crystalline tobacco Mosaic virus protein.
Science 83 : 626-627.

STANLEY W.M. 1937 - Chemical studies on the virus of tobacco Mosaic. The isolation of a crystalline protein possessing the properties of aucuba mosaic virus.
J. Biol. Chem. 117 : 325-340.

STANLEY G. JENSEN 1969 - Occurence of virus particules in the phloem tissue of Barley Yellow Dwarf Virus - Infected Barley.
Virology 38 : 83-91.

STEGWEE D. PONSEN M.B. 1958 - Multiplication of potato leafroll virus in the aphid Myzus persicae sulz.
Ent. Exp. E. Appl. 291-300.

STEGWEE D., and PETERS S.D. 1961 - The isolation of potato leafroll virus from its vector.
Virology 15 : 202-203.

SUGAWARA M. KOJIMA M. MURAYAMA D. 1974 - Latent period and retention of potato leafroll virus in its vector Myzus persicae.
Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 40 : 39-45.

TAKANAMI Y., & KUBO S. 1979a - Enzyme-assisted purification of two phloem-limited viruses : tobacco necrotic dwarf and potato leafroll.
Journal of General Virology 44 : 153 - 159.

TAMADA T., 1975 - Studies on the soybean dwarf disease.
Rep. Hokkaido prefectural Agric. Exp. Sta. n° 25 : 1-144.

TOYODA L.S., KIMURA I. and SUZUKI N. 1965 - Purification of rice dwarf virus.
Ann. Phytopath. Soc. Japan XXX (4) : 225-230.

TRESH J.M., ADAMS A.N. BARBARA D.J., CLARK M.F. - The detection of three virus of hop (humulus lupulus) by enzyme linked immunosorbent assay .
Annals of applied biology 87 : 57-65.

U.S. Departement of Agriculture 1965 - Losses in agriculture U.S. Dep. Agric. Handb. 291-120 p.

VOLLER A., BIDWELL D., HULOT G., et ENGWALL E., 1974 - Amicroplate method of enzyme-linked immunosorbent assay and its application to malaria.
Bultein of the world heath organization 51 209 - 211.

VOLLER A., BARLETT Ann., BIDWELL D.E., CLARK M.F., ADAMS A.N. 1976 - The detection of viruses by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).
J. Gen. Virol. 33 : 165-167.

VOLOVITCH M., DRUGEON G., and YOT P. 1978 - Studies on the single-stranded discontinuities of the cauliflower mosaic virus genome.
Nucl. Acids Res. Vol. 5 n° 8 : 2913-2925.

WEBB R.H., LARSON et WALKER J.C. 1952 - Relationships of potato leafroll virus strains.
wis. agric. Exp. Stn. Res. Bull. 178, : 1-40.

WHITCOMB R.F., and BLOCK L.M., 1961 - Synthesis and assay of wound-tumor soluble antigen in an insect vector.
Virology 15 : 136-145.

WILSON J. and R.C. CLOSE 1973 - Subterranean clover red leaf virus and other legume viruses in Canterbury.
New Sealand J. Agric. Res 16 : 305-310.

WYATT S.D. and KUHN C.W. 1977 - Highly infections RNA isolated from cowpea chlorotic mottle virus with low specifie infectivity -
J. Gen. Virology 35 : 175-180.

YAMAMOTO K.R., ALBERTS B.M., BENZINGER R., LAWHORNE L., and TREIBER, 1970 - Rapid Bacteriophage Sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its Application to large-Scale Virus Purification.
Virology 40 : 734-744.

* BAWDEN 1935 - Br J. Exp. Pathol. 16 : 435 (10).

* BAWDEN and PIRIE 1938 - Br J. Exp. Pathol. 19 : 251. (1,6)

* RICHARDS K.E., G., JAQUEMOND, M. & LOT, H. 1978 - Nucleotide sequence of cucumber mosaic virus-associated RNA 5.
Virology 89, : 395-408.

*WILLIAMS R.C. and WYCKOFF R.W.G. 1945 - Proc Soc Exp. Biol. Med. 58, 265.